

**Synthese**  
**modifizierter Peptidnukleinsäuren**  
**und deren Anwendung**  
**zur DNA-Analyse**

Inaugural-Dissertation

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

Vorgelegt von  
Diplom-Chemikerin  
Iris Boll  
aus  
Frankfurt am Main  
**2005**

## Kurzfassung in Deutsch

Im Verlauf dieser Arbeit wurden Metallkomplex-funktionalisierte Peptidnucleinsäuren und intern modifizierte Peptidnucleinsäuren synthetisiert und deren Anwendung zur sequenzspezifischen DNA-Analyse untersucht.

Ligationsreaktionen modifizierter Oligonucleotide (und deren Analoga) am Nucleinsäure-Templat finden Anwendung zur Detektion von DNA. Die Produkte dieser Reaktionen binden dabei deutlich stärker an das DNA-Templat als die Edukte. Daher sind diese Umsetzungen meist stöchiometrisch. Katalytische, Templat-gesteuerte Reaktionen wären für die Analyse wesentlich interessanter, da dann ein DNA-Molekül zur Umsetzung einer Reihe von Edukten führen könnte. Durch diesen Effekt wäre die Analyse geringer Mengen von DNA möglich.

In dieser Arbeit wurde die katalytische Hydrolyse einer Ester-PNA durch ein  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplex-PNA-Konjugat untersucht, die sowohl durch Einzelstrang-DNA als auch durch Doppelstrang-DNA gesteuert werden kann. Die Hydrolyse einer Ester-PNA am Einzelstrang-DNA-Templat, die durch den Kupferkomplex einer Katalysator-PNA katalysiert wird, erreicht eine > 100-fache kinetische Diskriminierung zwischen DNAs, die sich nur an einer einzigen Nucleotid-Position unterscheiden. Auf Basis dieser Reaktion konnte eine vollständig homogene, empfindliche Methode zur sequenzspezifischen Detektion von Einzelstrang-DNA (10 fmol DNA) entwickelt werden. In einem einzelnen Experiment ist mit dieser Methode die Erkennung einer von vier DNAs, die sich nur in einer einzelnen Position unterscheiden, möglich.

In Gegenwart eines Doppelstrang-DNA-Templates, welches zu der Ester-PNA und der PNA-LCu komplementär ist, ist die anfängliche Spaltgeschwindigkeit 7-mal höher als in Abwesenheit eines Templates. Durch „mismatch“-Doppelstrang-Templates, die entweder auf der Seite, an der die Ester-PNA bindet, oder auf der Seite, an der die PNA-LCu bindet, Fehlbasenpaarungen enthalten, wird die Ester-Hydrolyse im Vergleich zur Hintergrund-Hydrolyse (ohne Templat) nicht wesentlich beschleunigt.

Da das  $\text{Cu}^{2+}$ -Ion vermutlich fest an ein Assoziat gebunden ist, das aus der Substrat-PNA, der Katalysator-PNA und dem Einzelstrang- bzw. Doppelstrang-DNA-Templat besteht, kann diese Analysenmethode auch bei Systemen mit Puffern, die  $\text{Cu}^{2+}$ -bindende Liganden enthalten, angewendet werden, wie z. B. PCR-Puffer und physiologischer Puffer.

Zur DNA-Analyse können auch Reaktionen komplementärer Peptidnucleinsäuren verwendet werden, die durch Hybridisierung nicht beschleunigt, sondern inhibiert werden. In dieser Arbeit wurde die Spaltung einer intern Disulfid-modifizierten PNA untersucht. Als

Spaltreagenzien wurden verschiedene Phosphine und Thiole getestet. Die beste Selektivität konnte mit Tris-(carboxyethyl)-phosphin erreicht werden. Dieses Phosphin spaltet die Einzelstrang-Disulfid-PNA 33-mal schneller als die Disulfid-PNA in der PNA / DNA-Duplex.

## Short summary in english

Within this study metal complex functionalized peptide nucleic acids and internally modified peptide nucleic acids were synthesized and their reactions on DNA templates have been investigated.

Ligations of oligonucleotides (and their analogues) on nucleic acid templates are used in detection of DNA. Products of these reactions are considerably stronger binders of DNA templates than the educts are. Therefore these reactions are usually stoichiometric. Catalytic templated reactions are much more interesting for analysis, because one DNA molecule can trigger transformation of several educts. This amplification effect can allow analysis of low amounts of DNA.

In this study a reaction of catalytic ester-PNA hydrolysis by Cu(II) complex-PNA conjugates, which is triggered by single-stranded DNA as well as double-stranded DNA as templates, has been investigated. The hydrolysis of an ester-PNA on a single-stranded DNA template catalysed by a copper complex of a catalyst-PNA provides > 100 fold kinetic discrimination between DNAs, which are different from each other only at a single nucleotide position. On the basis of this reaction a fully homogeneous and sensitive assay for sequence specific detection of single stranded DNA has been developed (10 fmol DNA). Identification of one of four DNAs (variation at one position) can be done in a single experiment.

In the presence of a double-stranded DNA template, which is complementary to ester-PNA and PNA-LCu, the initial cleavage of ester-PNA is 7 times faster than in the absence of any template. Double-stranded templates with mismatches at binding sites of either ester-PNA or PNA-LCu do not significantly accelerate hydrolysis of ester-PNA relative to its background hydrolysis.

Since Cu<sup>2+</sup> ion is tightly bound in an associate containing the ester-PNA, the metal complex-PNA and the template DNA (single-stranded or double-stranded), application of this method in buffers containing other Cu<sup>2+</sup> binding ligands, e.g. PCR buffer and physiological buffer, is possible.

Reactions of nucleic acids, which are inhibited rather than triggered by their complementary strands, can be also used in analysis. In this study cleavage of an internally disulfide-modified PNA was investigated. A couple of phosphines and thiols were tested as cleaving reagents. Tris-(carboxyethyl)-phosphine is the mostly selective cleaver of single-stranded disulfide-PNA substrates among tested reducing agents. It cleaves single-stranded disulfide-PNA 33 times faster than disulfide-PNA in the PNA / DNA-duplex.

**Synthese**  
**modifizierter Peptidnukleinsäuren**  
**und deren Anwendung**  
**zur DNA-Analyse**

Inaugural-Dissertation

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

Vorgelegt von  
Diplom-Chemikerin  
Iris Boll  
aus  
Frankfurt am Main  
Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2005

**Synthese**  
**modifizierter Peptidnukleinsäuren**  
**und deren Anwendung**  
**zur DNA-Analyse**

Gutachter: Prof. Dr. Roland Krämer  
Prof. Dr. Gerald Linti

*Nach den anerkannten flugmechanischen Gesetzen  
kann die Hummel wegen ihrer Gestalt und ihres Gewichtes  
im Vergleich zur Flügelfläche nicht fliegen.  
Aber die Hummel weiß es nicht und fliegt trotzdem.*

Rolf Schneider

Die experimentellen Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit wurden im Anorganisch-Chemischen Institut der Ruprecht-Karls-Universität zu Heidelberg in der Zeit von März 2003 bis Februar 2005 durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Roland Krämer und Dr. Andriy Mokhir, unter deren Anleitung diese Arbeit angefertigt wurde, danke ich herzlich für zahlreiche Anregungen, Diskussionen, ihr stetes Interesse an meiner Arbeit und die großzügige materielle Unterstützung.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. DNA und PNA</b> .....	<b>1</b>
1.1.1. Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) .....	1
1.1.2. Die Peptidnukleinsäure (PNA) .....	2
<b>1.2. Schmelzpunktmessungen</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3. Grundlagen der HPLC</b> .....	<b>6</b>
<b>1.4. Grundlagen der MALDI-TOF-Massenspektrometrie</b> .....	<b>7</b>
<b>1.5. Reaktionen am DNA-Templat</b> .....	<b>8</b>
<b>1.6. Konzept der Arbeit</b> .....	<b>11</b>
<b>2. Zielsetzung</b> .....	<b>17</b>
<b>3. Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1. Übersicht dargestellter Verbindungen</b> .....	<b>18</b>
3.1.1. N-modifizierte PNAs .....	18
3.1.2. C-modifizierte PNAs .....	19
3.1.3. Intern modifizierte PNAs .....	19
3.1.4. Verwendete DNAs .....	19
3.1.5. Verwendete Spaltreagenzien .....	21
<b>3.2. Metallkatalysierte Reaktionen am DNA-Templat</b> .....	<b>21</b>
<b>3.2. Metallkatalysierte Reaktionen am DNA-Templat</b> .....	<b>22</b>
3.2.1. Synthesen .....	22
3.2.2. Optimierung der Templat-gesteuerten Hydrolyse-Reaktion .....	25
3.2.3. Detektion von einzelnen Nukleotid-Variationen in DNA mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie .....	31
<b>3.3. Metall-Komplex-Katalyse am Doppelstrang-DNA-Templat</b> .....	<b>38</b>
3.3.1. Hybridisierungsexperimente .....	38
3.3.2. Untersuchung der Esterspaltung am Doppelstrang-DNA-Templat mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie .....	40
3.3.3. Untersuchung der Esterspaltung am Doppelstrang-DNA-Templat mittels HPLC .....	44
<b>3.4. Hybridisierungsabhängige Spaltung von intern Disulfid-modifizierten Peptidnukleinsäuren</b> .....	<b>46</b>
3.4.1. Synthesen .....	46
3.4.2. Hybridisierungsexperimente .....	47
3.4.3. Optimierung der Disulfid-PNA-Spaltung .....	48
<b>4. Zusammenfassung</b> .....	<b>54</b>
<b>5. Experimenteller Teil</b> .....	<b>55</b>
<b>5.1. Geräte und Chemikalien</b> .....	<b>55</b>

<b>5.2. Synthesen der Ligand-PNA- und Ester-PNA-Konjugate für die DNA-Templat-gesteuerte Esterhydrolyse.....</b>	<b>56</b>
<b>5.3. Synthesen der intern Disulfid-modifizierten PNAs .....</b>	<b>60</b>
<b>5.4. Durchführung der Schmelzpunktuntersuchungen .....</b>	<b>62</b>
<b>5.5. MALDI-TOF-massenspektrometrische Untersuchungen der Ester-Hydrolyse.....</b>	<b>64</b>
5.5.1. Ester-Hydrolyse am Einzelstrang-DNA-Templat.....	64
5.5.2. Ester-Hydrolyse am Doppelstrang-DNA-Templat .....	64
<b>5.6. Untersuchungen der Ester-Hydrolyse mit Hilfe von HPLC.....</b>	<b>65</b>
5.6.1. Ester-Hydrolyse am Einzelstrang-DNA-Templat.....	65
5.6.2. Ester-Hydrolyse am Doppelstrang-DNA-Templat .....	65
<b>5.7. Untersuchungen der Disulfidspaltung mit Hilfe von HPLC .....</b>	<b>66</b>
5.7.1. Spaltung der PNAs 43a-c mit Phosphinen .....	66
5.7.2. Spaltung der PNAs 43a-c mit Thiolen.....	66
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>67</b>

## Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1: Die DNA-Doppelhelix.....</i>	<i>1</i>
<i>Abb. 2: PNA / DNA-Duplex.....</i>	<i>3</i>
<i>Abb. 3: Schmelzkurven.....</i>	<i>5</i>
<i>Abb. 4: Templat-katalysierte Nitrophenylester-Spaltung.....</i>	<i>9</i>
<i>Abb. 5: Strukturvorschlag für den S:CuL-Komplex.....</i>	<i>11</i>
<i>Abb. 6: Cu<sup>2+</sup>-Komplex-katalysierte Ester-Hydrolyse am Doppelstrang-DNA-Templat.....</i>	<i>13</i>
<i>Abb. 7: Mechanismus der Disulfidspaltung mit Triphenylphosphin.....</i>	<i>15</i>
<i>Abb. 8: Hydrolyse der PNA 6a durch Cu<sup>2+</sup>-PNA 16a in Anwesenheit und Abwesenheit von DNA 17.....</i>	<i>26</i>
<i>Abb. 9: Anwendung der DNA-Templat-gesteuerten Esterhydrolyse bei der sequenz-spezifischen DNA-Detektion.....</i>	<i>31</i>
<i>Abb. 10: MALDI-TOF-Massenspektrum einer Mischung von S-Linker-PNAs 11a-C, T, A, G, Katalysator Cu<sup>2+</sup>-PNA 16a mit und ohne Templat-DNA 18, aufgenommen 60 min nach Zusammengeben der Komponenten.....</i>	<i>32</i>
<i>Abb. 11: Relative Mengen der verschiedenen S-Linker-PNAs 11a-C, T, A, G in ihrer Mischung in Anwesenheit des DNA -Templates 18.....</i>	<i>34</i>
<i>Abb. 12: Relative Mengen der verschiedenen S-Linker-PNAs 11a-C, T, A, G in ihrer Mischung in Abwesenheit eines DNA -Templates.....</i>	<i>35</i>
<i>Abb. 13: MALDI-TOF-Massenspektrum einer Mischung der S-Linker-PNAs 11a-C, T, A, G, dem Katalysator Cu<sup>2+</sup>-PNA 16a mit und ohne die Templat-DNA 20, aufgenommen 60 min nach Zusammengeben der Komponenten.....</i>	<i>35</i>
<i>Abb. 14: MALDI-TOF-Massenspektren von Mischungen der S-Linker-PNAs 11a-C, T, A, G, der Cu<sup>2+</sup>-PNA 16a und verschiedene Mengen der DNA 17.....</i>	<i>36</i>
<i>Abb. 15: Schmelzprofile der DNA 34 : DNA 37 - Duplex in Abwesenheit und Anwesenheit der Ester-PNA 11c.....</i>	<i>39</i>
<i>Abb. 16: Analyse der Hydrolyse der Ester-PNA 11c am dsDNA-Templat mittels MALDI-TOF .....</i>	<i>40</i>
<i>Abb. 17: Hydrolyse der Ester-PNA 11c durch die Cu<sup>2+</sup>-PNA-L 14b in Anwesenheit und Abwesenheit der DNA 34 : DNA 37 - Duplex.....</i>	<i>41</i>
<i>Abb. 18: Analyse der Hydrolyse der Ester-PNA 11c in Anwesenheit und Abwesenheit katalytischer Mengen des dsDNA-Templates mittels MALDI-TOF.....</i>	<i>43</i>

<i>Abb. 19: Hydrolyse der Ester-PNA 11c durch die Cu<sup>2+</sup>-PNA-L 14b in Phosphat-Puffer in Anwesenheit und Abwesenheit der DNA 34 : DNA 37 - Duplex.....</i>	<i>44</i>
<i>Abb. 20: HPLC-Analyse der Hydrolyse der Ester-PNA 11c am dsDNA-Templat.....</i>	<i>45</i>
<i>Abb. 21: HPLC-Elutionprofile der Mischungen von PNA 43a mit 3 Äquivalenten komplementärer DNA 44, „mismatch“-DNA 44b bzw. 44c und ohne DNA, aufgenommen 5 h nach Zugabe von P1.....</i>	<i>51</i>
<i>Abb. 22: Spaltung der PNA 43b durch das Phosphin P5 in Anwesenheit und Abwesenheit von komplementärer DNA 45.....</i>	<i>52</i>

## Schemataverzeichnis

<i>Schema 1: Umsetzung am ssDNA- bzw. dsDNA-Templat.....</i>	<i>11</i>
<i>Schema 2: Spaltung einer in der Mitte einer PNA gelegenen Disulfid-Gruppe in Anwesenheit und Abwesenheit von komplementärer DNA.....</i>	<i>14</i>
<i>Schema 3: Synthesen der am N-Terminus mit einer Ester-Gruppe modifizierten Peptidnuklein- säuren.....</i>	<i>23</i>
<i>Schema 4: Synthesen der am N-Terminus mit einer Ester-Gruppe modifizierten Peptidnuklein- säuren und der am C-Terminus modifizierten Katalysator-Peptidnukleinsäuren... </i>	<i>24</i>
<i>Schema 5: Sequenzen und Nummerierung der DNAs.....</i>	<i>27</i>
<i>Schema 6: Sequenzen der Ester-PNA, der PNA-L und der DNAs, die für die Reaktionen am dsDNA-Templat verwendet wurden.....</i>	<i>38</i>
<i>Schema 7: Synthesen der intern modifizierten PNAs.....</i>	<i>46</i>
<i>Schema 8: Getestete Spaltreagenzien der Disulfid-modifizierten PNAs.....</i>	<i>49</i>

## Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 1: Optimierung des Signal-Hintergrund-Verhältnisses für die DNA-Templat-gesteuerte Ester-PNA-Hydrolyse.....</i>	<i>28</i>
<i>Tab. 2: Ausbeuten und relative Geschwindigkeiten der Ester-PNA <b>11c</b>-Spaltung am dsDNA-Templat.....</i>	<i>42</i>
<i>Tab. 3: Schmelzpunkte von PNA / DNA-Duplicates.....</i>	<i>47</i>
<i>Tab. 4: Spaltung der Disulfid-PNA durch verschiedene Phosphine und Thiole.....</i>	<i>50</i>

**Abkürzungen**

A	Adenin
Alloc	Allyloxycarbonyl
ATP	Adenosintriphosphat
Bhoc	Benzyldihydroxycarbonyl
Boc	t-Butyloxycarbonyl
C	Cytosin
CDI	Carbonyldiimidazol
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Dichlormethan
CH <sub>3</sub> CN	Acetonitril
CPG	Controlled Pore Glas
CuSO <sub>4</sub>	Kupfersulfat
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIEA	Diisopropylethylamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMF	Dimethylformamid
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsDNA	Doppelstrang-DNA
eq	Äquivalente
Fmoc	N-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)
FW	formula weight
G	Guanin
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3,-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
H <sub>2</sub> O	Wasser
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
I	Intensität
Im	N-Methyl-2-imidazolyl
KCl	Kaliumchlorid
L	Ligand
Lys	Lysin

M	Metall
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight
MeOH	Methanol
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
m / z	Masse pro Ladung
NaCl	Natriumchlorid
NiSO <sub>4</sub>	Nickelsulfat
NH <sub>3</sub>	Ammoniak
PCR	polymerase chain reaction
PG	Schutzgruppen der Nukleobasen
PNA	Peptidnukleinsäure
Py	2-Pyridyl
RNA	Ribonukleinsäure
R <sub>t</sub>	Retentionszeit
Ref	Referenz
S	Substrat
SF	Selektivitätsfaktor
ssDNA	Einzelstrang-DNA
T	Thymin
TFA	Trifluoressigsäure
T <sub>m</sub>	Schmelzpunkt
UV / VIS	ultraviolett / visible (Wellenlängenbereich)
V / V	Verhältnis der Volumina
$v_0^{\text{cat}} / v_0^{\text{uncat}}$	Verhältnis der Geschwindigkeiten von katalysierter zu Hintergrund-Reaktion
ZnCl <sub>2</sub>	Zinkchlorid

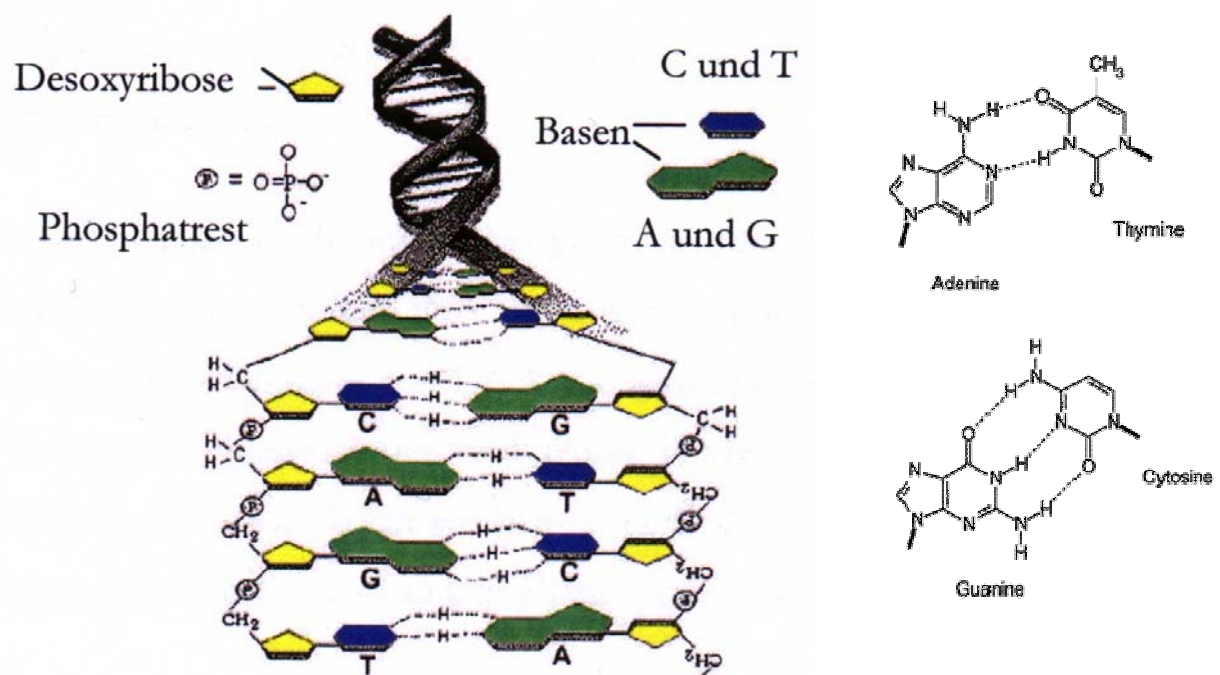


# 1. Einleitung

## 1.1. DNA und PNA

### 1.1.1. Die Desoxyribonukleinsäure (DNA)

Die DNA (Desoxyribonukleinsäure) trägt die Erbinformation, ist also bestimmend für den Aufbau der Lebewesen. Die Aufklärung der Struktur der DNA von Watson und Crick 1953 wird oft als Geburt der modernen Biochemie bezeichnet. DNA besteht aus zwei antiparallelen Strängen, die eine Doppelhelix (**Abb. 1**) bilden.



**Abb. 1:** Die DNA-Doppelhelix.

Ein DNA-Einzelstrang ist ein fadenförmiges Biopolymer, das aus Nukleotiden aufgebaut ist. Diese bestehen aus einer Purin- oder Pyrimidinbase, einer Phosphatgruppe und einer Zuckereinheit. Bei dem Zucker handelt es sich um eine 2'-Desoxyribose. Die Zucker- und Phosphatgruppen bilden das sogenannte Rückgrat der DNA, wobei die 3'-Hydroxygruppe jedes Zuckers über eine Phosphodiesterbrücke mit der 5'-Hydroxygruppe der nächsten Zuckereinheit verbunden ist.

Die Basen liegen in der DNA als Purinbasen Adenin (A) und Guanin (G) sowie den Pyrimidinbasen Thymin (T) und Cytosin (C) vor (**Abb. 1**). Die Phosphodiesterbindung ist gegenüber einer hydrolytischen Spaltung viel stabiler als beispielsweise eine Esterbindung<sup>[1]</sup>. Da der Phosphodiester bei physiologischem pH-Wert außerdem als Anion vorliegt, wird ein nukleophiler Angriff noch zusätzlich erschwert<sup>[2]</sup>.

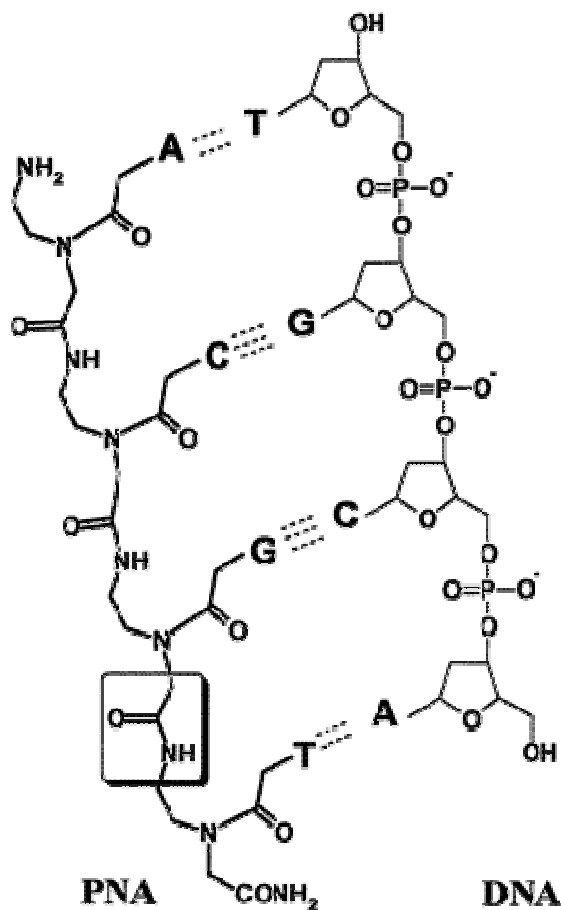
Durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen zweier DNA-Stränge entsteht die Doppelhelix. Dabei ist Adenin immer an Thymin und Guanin immer an Cytosin gebunden (Watson-Crick-Basenpaarung<sup>[3]</sup>) (**Abb. 1**). Die Abfolge der Basen codiert die einzelnen Gene.

Die DNA-Duplex kann in verschiedenen Doppelstrangkongformationen vorkommen. Diese hängt von ihrer Länge, ihrer Sequenz und dem Natriumchloridgehalt der Lösung ab. Die am häufigsten vorkommende Kongformation ist die sogenannte B-DNA, die in einer rechtsgängigen Helix existiert. Dabei besteht jede Windung aus 10 Nukleobasen mit einem Abstand von jeweils 3,4 Å, woraus sich eine Windungslänge von 34 Å ergibt. Des weiteren gibt es noch die A-DNA und die Z-DNA.

Die DNA-Analyse, -Modifizierung und -Reparatur sind von hohem Interesse, da schon geringe Änderungen im molekularen Aufbau der DNA gravierende Auswirkungen haben. So konnte durch die Erfindung der PCR (polymerase chain reaction) und durch Verwendung von Restriktionsnukleasen innerhalb weniger Jahre das menschliche Genom vollständig entschlüsselt werden<sup>[4]</sup>. Die neuen Verfahren finden auch bei der Herstellung schwer zugänglicher Proteine und zur Analyse neuer Gene Verwendung. Von besonderer Bedeutung ist der Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen, der zur Früherkennung von Erbkrankheiten und in der Tumordiagnostik genutzt werden kann.

### **1.1.2. Die Peptidnukleinsäure (PNA)**

PNA (Peptidnukleinsäure) ist ein DNA-Analogon und wurde 1991 von Nielsen *et al.*<sup>[5]</sup> erstmals beschrieben. PNA besitzt im Gegensatz zum Desoxyribose-Phosphodiester-Rückgrat der DNA ein Pseudopeptidgerüst, mit dem die Basen über Methylen-Carbonyl-Bindungen verbunden sind (**Abb. 2**).



**Abb.2:** PNA-DNA-Duplex.

Das Pseudopeptidgerüst der PNA ist dem Rückgrat der DNA strukturell so ähnlich, daß PNA sowohl PNA / DNA-Duplices als auch (PNA)<sub>2</sub> / DNA-Triplices bilden kann<sup>[6][7]</sup>. Bei den Triplices ist ein PNA-Strang nach der Watson-Crick-Regel an einen DNA-Strang gebunden, wohingegen der zweite PNA-Strang über Hoogsteen-Basenpaarung an den DNA-Strang bindet. Ein Vorteil der PNA gegenüber der DNA ist, daß PNA säurestabil ist. Dies ermöglicht die Synthese der PNA mit Hilfe gewöhnlicher Schutzgruppen aus der Peptidchemie, die eine Abspaltung durch Trifluoressigsäure erfordern. Außerdem sind PNA / DNA-Duplices bei niedrigen Salzkonzentrationen stabiler als die entsprechenden DNA / DNA-Duplices. Ferner besitzt PNA auch eine hohe Biostabilität<sup>[8]</sup>. Ein besonders wichtiger Vorteil, der für die Verwendung von PNA (z.B. in dieser Arbeit) spricht, ist die stärkere Affinität zu DNA in Verbindung mit höherer Sequenzselektivität sowie die schnelle Assoziation / Dissoziation der PNA / DNA-Doppelhelix. Das ermöglicht die Anwendung von PNA bei Kinetik-Untersuchungen katalytischer Reaktionen, da bei diesen hohe „turn-over-numbers“ erforderlich sind.

Ein Nachteil ist die im Vergleich zur DNA schlechtere Wasserlöslichkeit der PNA, die mit zunehmender Basenzahl abnimmt. Dieses Problem läßt sich jedoch durch Modifikation der PNA mit geladenen Gruppen wie zum Beispiel Lysin lösen<sup>[9]</sup>.

## 1.2. Schmelzpunktmessungen

Die sequenzspezifische Hybridisierung komplementärer Einzelstränge zu einer Doppelhelix ist reversibel. Dieser Vorgang wird als Renaturierung / Denaturierung oder als „thermisches Schmelzen“ bezeichnet. Durch Erwärmen des DNA-Doppelstrangs brechen die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren auf, wodurch man wieder zwei Einzelstränge erhält<sup>[10][3]</sup>.

Schmelzpunkt nennt man den Punkt, an dem 50 % des Doppelstrangs dissoziiert vorliegen. Er ist also ein Maß für die thermodynamische Stabilität eines Duplexmoleküls.

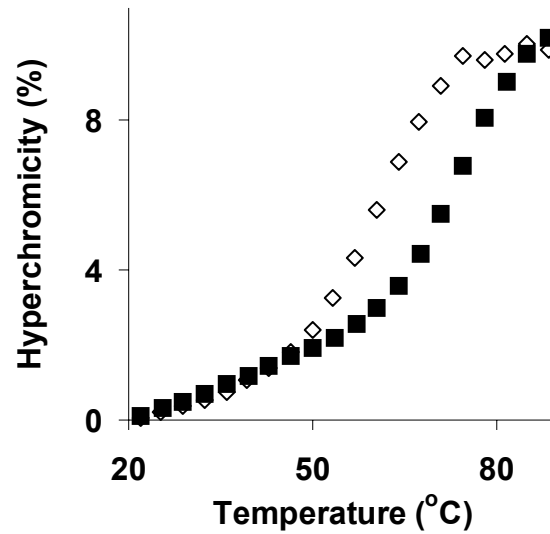
Die Stabilität ist außer von der Temperatur noch von mehreren anderen Faktoren abhängig<sup>[11]</sup>. Ein GC-Basenpaar wird durch drei Wasserstoffbrückenbindungen gebildet, wohingegen ein AT-Basenpaar nur zwei Wasserstoffbrückenbindungen besitzt. Daher sind die Watson-Crick-Basenpaare nicht gleich stabil. Das hat zur Folge, daß die Duplex umso stabiler ist, je mehr GC-Basenpaare sie besitzt.

Da die Dissoziation eines Doppelstrangs meist von den Enden her erfolgt, spielt auch die Basensequenz eine Rolle. Ein GC-Basenpaar an einer terminalen Position erschwert daher die Dissoziation stärker als ein GC-Basenpaar an einer mittleren Position.

Die Helixstabilität nimmt außerdem mit wachsender Duplexlänge zu, da immer mehr Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden können.

Auch bei Erhöhung der Kationenkonzentration kann die Stabilität der Duplex erhöht werden, denn Nukleinsäuren sind Polyanionen, die sich bei der Ausbildung der Doppelhelix annähern müssen. Daher sollten sie sich wegen der Coulomb'schen Kräfte zunächst abstoßen. Die Kationen können die negativen Ladungen der Phosphodiester kompensieren.

Ermittelt werden kann der Schmelzpunkt durch UV-Spektroskopie, da die Absorption bei 260 nm für komplementäre Einzelstränge um ca. 10-40 % höher liegt als für eine DNA-Doppelhelix und ca. 5-10 % höher als für eine PNA / DNA-Doppelhelix. Das ist eine Folge der Änderung der optischen Dichte beim Aufbrechen des Doppelstrangs. Diesen Effekt nennt man Hyperchromizität. Er ist auf die Basenstapelung in der Doppelhelix zurückzuführen, denn in dieser Anordnung sind die Übergangsdipolmomente der Nukleobasen gekoppelt, wodurch sich der Extinktionskoeffizient erniedrigt<sup>[12][11]</sup>.



**Abb. 3:** Schmelzkurven unterschiedlich stabiler Nukleinsäure-Doppelhelices.

Trägt man die Absorption bzw. die Hyperchromizität gegen die Temperatur auf, erhält man die sog. Schmelzkurve (**Abb. 3**). Der Wendepunkt des Graphen ergibt den Schmelzpunkt. Modifiziert man die PNA, ändern sich die sterischen und elektronischen Eigenschaften des Systems, wodurch sich der Schmelzpunkt erhöht oder erniedrigt<sup>[13]</sup>. Zum Beispiel wird die repulsive Abstoßung zwischen den beiden Einzelsträngen vermindert, wenn man ein negativ geladenes Sauerstoffatom in der Phosphodiesterbindung durch einen neutralen Substituenten ersetzt<sup>[14]</sup>.

### **1.3. Grundlagen der HPLC**

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ist eine physikalische Trennmethode. Die zu trennenden Komponenten verteilen sich dabei zwischen zwei Phasen. Eine Phase ist stationär und besteht aus Kieselgel, die andere ist mobil und besteht aus dem Lösungsmittel. In der Biochemie findet wegen der hohen Auflösung vor allem die Umkehrphasen-HPLC breite Anwendung. Auf diese Weise ist es z. B. möglich, auch Polypeptide zu trennen, die sich nur in einer einzigen Aminosäure unterscheiden. Der Unterschied zur normalen Chromatographie liegt in der Säule. Bei der Umkehrphasen-HPLC trägt das Kieselgel einen hydrophoben Alkylrest, bei normaler Chromatographie ist das nicht der Fall. Sobald die Polyamide in die Säule gelangen, werden sie von der hydrophoben Oberfläche adsorbiert und verbleiben dort solange, bis das organische Lösungsmittel (Acetonitril) die kritische Konzentration erreicht. Bei dieser Konzentration wird das Gleichgewicht zwischen fester und flüssiger Phase zur flüssigen hin verschoben. Dann findet langsam die Desorption statt, und das Molekül wird aus der Säule herausgespült. Eine praktische Konsequenz dieses Mechanismus ist, daß die Moleküle sehr empfindlich auf die Konzentration des organischen Lösungsmittels in der mobilen Phase reagieren. Ionenpaarungsreagenzien vergrößern die Separation und die Löslichkeit der Polyamide. Das am häufigsten verwendete Ionenpaarungsreagenz ist Trifluoressigsäure. Sie wird deshalb so häufig benutzt, weil sie leicht wieder aus den gesammelten Fraktionen zu entfernen ist und kein UV-Licht absorbiert.

## 1.4. Grundlagen der MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Matrix Assisted Laser Desorption / Ionisation (MALDI) wurde 1988 von Hillenkamp<sup>[15]</sup> als Methode vorgestellt, um große, labile Moleküle als intakte Ionen in die Gasphase zu bringen. Die zu untersuchende Substanz wird mit einem großen Überschuß einer Matrix-Verbindung, meist eine schwache organische Säure, gemischt. Diese Probe wird dann ins Vakuum gegeben und in ein MALDI-Time of Flight (TOF)-Massenspektrometer gefahren.

Diese Probenvorbereitung erlaubt eine präzise und schnelle Bestimmung des Molekulargewichtes von Peptiden, Proteinen, Kohlenhydraten, Nukleinsäuren, synthetischen Polymeren und anderen organischen Molekülen mit einem Molekulargewicht bis zu 100 kDa. Die Probe wird von einem Laserstrahl getroffen, wobei Ionen gebildet werden. Die Massen-Ladungsverteilung ( $m/z$ ) der Ionen kann durch Messung der Geschwindigkeit der Ionen bestimmt werden, nachdem diese in einem elektrischen Feld beschleunigt worden sind. Dies geschieht, indem man auf ein Ion elektrostatisch eine bestimmte kinetische Energie überträgt und dessen Flugzeit (TOF) in einem Feld-freien Bereich mißt. Am Ende der Feld-freien Zone befindet sich ein Detektor, der die Flugzeit für jedes Ion bestimmt. Bei konstanter kinetischer Energie fliegen kleine Ionen schneller als große, was sich aus folgender Beziehung ergibt:

$$E_{\text{kin}} = U z = \frac{1}{2} m v^2$$

Ionen mit einem bestimmten  $m/z$ -Verhältnis werden durch ein elektrostatisches Potential  $U$  zu einer Geschwindigkeit  $v$  und einer totalen kinetischen Energie  $E_{\text{kin}}$  beschleunigt. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß man innerhalb kurzer Zeit ein komplettes Spektrum des Massenbereiches erhält.

PNA ist in wäßriger Lösung bei  $\text{pH} \leq 7$  positiv geladen, daher wird für PNA-Untersuchungen der positive Detektor-Modus für MALDI-TOF-Massenbestimmungen gewählt.

Vor einiger Zeit konnte gezeigt werden, daß Maldi-TOF-Massenspektrometrie auch als quantitative Methode verwendet werden kann<sup>[16]</sup>. Das bedeutet, daß Komponenten von Mischungen nicht nur detektiert werden können, sondern auch eine Abschätzung ihrer absoluten Konzentrationen möglich ist. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit MALDI-TOF-Massenspektrometrie zusammen mit HPLC zur Untersuchung der Kinetik von Reaktionen verwendet. Im Vergleich zur HPLC ermöglicht MALDI-TOF eine wesentlich schnellere Analyse. Durch automatische Messung können bis zu 256 Proben innerhalb einer Meßreihe analysiert werden.

## 1.5. Reaktionen am DNA-Templat

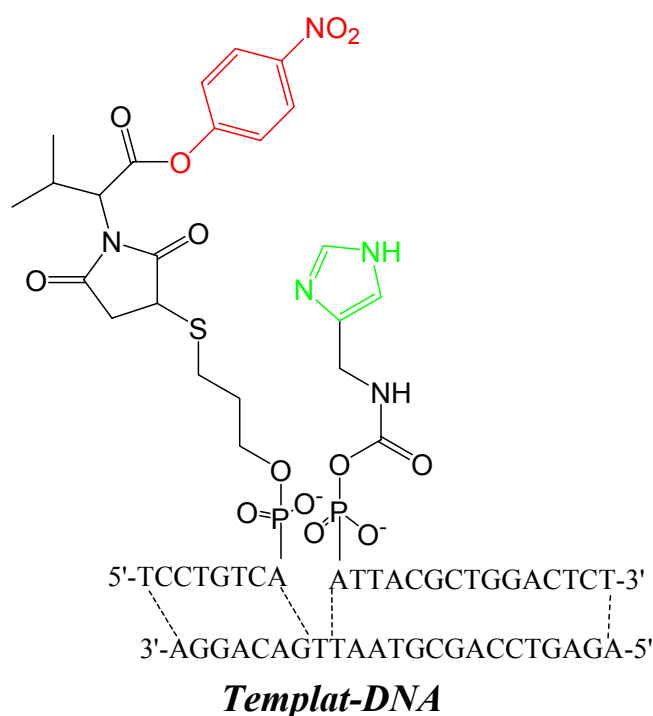
Da die DNA Träger der gesamten Erbinformation ist, hat ihre Analyse große Bedeutung, z. B. in der Medizin, der Molekularbiologie oder der Biotechnologie. Die sequenzspezifische Detektion von Nukleinsäuren ist ein wesentlicher Forschungsaspekt in den biologischen Wissenschaften und hat zunehmende Bedeutung für Diagnose und Genforschung erlangt<sup>[17]</sup>. Da die Menge der Nukleinsäuren in biologischen Systemen begrenzt ist, werden Hybridisierungsexperimente meist unter Verwendung katalytischer Reaktionen zur Nukleinsäurererkennung benutzt. Für den praktischen Gebrauch wichtige homogene katalytische Reaktionen, die durch Hybridisierung einer Probe mit der Ziel-Nukleinsäure gesteuert werden, sind z. B. „polymerase chain reaction“ (PCR), „Invader® assay“, „ligase chain reaction“ (LCR), „strand displacement amplification“ (SDA) and „rolling cycle amplification“ (RSA)<sup>[17]</sup>. Alle diese Reaktionen sind Enzym-katalysiert und haben daher hohe „turnover“-Raten. Trotz der vielen Anwendungsmöglichkeiten haben enzymatische Methoden auch einige Nachteile. So sind Enzyme oft ineffizient bei der Anwendung auf kurze Oligonukleotide, die die höchste Sequenz-Spezifität bieten. Sie erkennen auch keine nicht-natürlichen oder mit großen Substituenten modifizierten Proben. Außerdem eignen sich auf Enzymen basierende Analysenmethoden auch schlecht für *in vivo*-Untersuchungen, da es schwierig ist, Enzyme in Zellen zu bringen. Analysenmethoden, die nur auf synthetischen Reagenzien beruhen, hätten den Vorteil weniger störungsanfällig und ökonomischer zu sein. Naylor *et al.* beschrieb 1966 die erste nicht-enzymatische Reaktion am DNA-Templat<sup>[18]</sup>. Er verknüpfte zwei Thymidin-Hexanukleotide, unter Verwendung eines Polyadenosins als Templat. Die Ausbeute betrug allerdings nur 5 % nach 4 Tagen. Eine deutliche Verbesserung beschrieb Kiedrowski *et al.* 1986, dem durch geschickte Sequenzwahl die erste autokatalysierte Reaktion am DNA-Templat gelang<sup>[19]</sup>. Aufgrund starker Produktinhibierung betrug die Ausbeute dieser Reaktion allerdings nur 12 % bei minimalem „turnover“.

Einige neuere Untersuchungen haben sich damit beschäftigt, Hybridisierungsreaktionen mit nicht-enzymatischen Reaktionen zu verbinden, mit dem Ziel, die oben erwähnten Nachteile zu umgehen<sup>[20]</sup>. Z. B. wurden von Kool *et al.* Phosphothioat - Iodid - DNA-Ligationen an Templat-DNAs und -RNAs beschrieben<sup>[21]</sup>. In diesem Fall tragen zwei Oligonukleotide jeweils terminal eine funktionelle Gruppe, die miteinander reagieren können. Die Reaktion zwischen den beiden Gruppen wird durch komplementäre DNA begünstigt, da die funktionellen Gruppen durch die Bindung an die DNA in räumliche Nähe gebracht werden,



wodurch die Reaktion leichter ablaufen kann. Die Reaktion läuft also in Anwesenheit komplementärer DNA schneller ab als ohne diese. Diese Reaktionen sind, was die Sequenz-Genauigkeit angeht, spezifischer als analoge enzymatische Ligationen, die durch T4 DNA Ligase katalysiert werden. Ein Nachteil dieser Reaktionen ist jedoch, dass ein katalytischer „turnover“ nur in Anwesenheit eines enormen Überschusses ( $10^4$ -fach) der DNA-Proben erreicht werden kann, da die Ligationen durch die entstehenden Produkte inhibiert werden. Dadurch wird die Empfindlichkeit der DNA-Analyse durch Templat-Reaktionen stark eingeschränkt. Diese Produktinhibierung tritt auf, da das Produkt, das durch Verknüpfung der an das Templat gebundenen Edukte entsteht, viel stärker an das Templat bindet als die Edukte. Die Empfindlichkeit dieser Methode wird außerdem durch langsame „turnover“-Raten verringert.

Über eine Alternative wurde von Taylor *et al* berichtet<sup>[22]</sup>. Er beschreibt die Hydrolyse von aktivierten Estern in Anwesenheit von Imidazol-Derivaten am DNA- (Abb. 4) oder RNA-Templat und Staudinger-Reaktionen am DNA-Templat. Bei diesen Reaktionen wird durch das Templat also eine Spaltung und nicht eine Bindungsbildung initiiert.



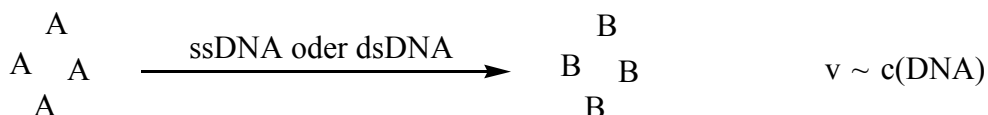
**Abb. 4:** Templat-katalysierte Nitrophenylester-Spaltung.

Ein entscheidender Vorteil dieser Templat-gesteuerten Spaltreaktionen ist, dass das Problem der Produktinhibierung deutlich weniger ausgeprägt ist, da die Affinität der Produkte und Substrate zum DNA-Templat sich nicht wesentlich unterscheiden. Daher kann die

Empfindlichkeit der DNA-Detektion durch katalytischen „turnover“ erhöht werden. Obwohl die „turnover“-Zahlen und die Reaktionsgeschwindigkeiten dieser Reaktionen für eine praktische Anwendung des Verfahrens noch nicht ausreichend groß sind, können diese Reaktionen als Ausgangspunkt für Untersuchungen weiterer Templat-Reaktionen dienen, die sowohl sequenz-spezifisch als auch sehr empfindlich sind.

## 1.6. Konzept der Arbeit

Reaktionen, die durch DNA-Einzelstränge oder -Doppelstränge beschleunigt oder inhibiert werden, eignen sich potentiell zur DNA-Sequenzanalyse. Hierbei wird ein Stoff A am DNA-Templat zu einem Stoff B umgesetzt, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit direkt von der DNA-Konzentration abhängt (**Schema 1**).

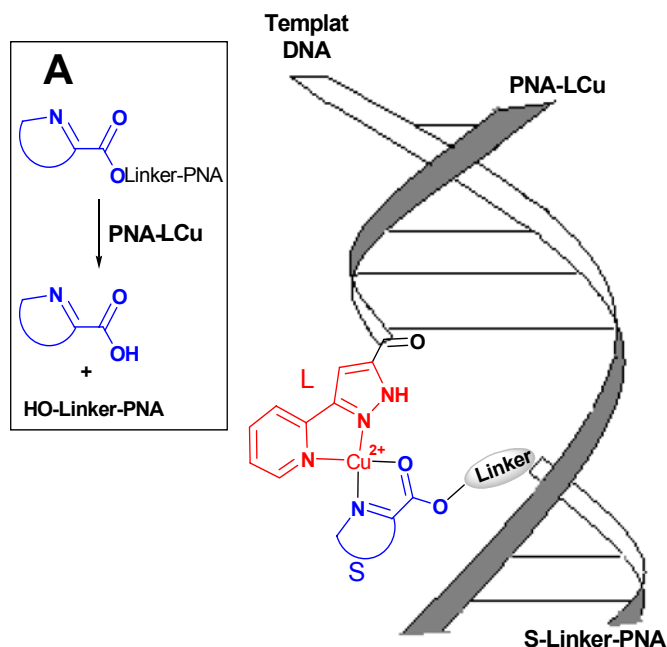


**Schema 1:** Umsetzung am ssDNA- bzw. dsDNA-Templat.

A: Edukt, B: Produkt.

Reaktionen, die am Templat schneller ablaufen sind bereits literaturbekannt. Von Reaktionen, die durch das DNA-Templat inhibiert werden, wurde hingegen bisher nicht berichtet.

Vor kurzem wurde ein Artikel zur Hydrolyse von Picolinsäure-Estern (S) in N-modifizierten Peptidnukleinsäuren (S-Linker-PNA) durch eine  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplex-PNA (PNA-LCu) (**Abb. 5**) am DNA-Templat veröffentlicht<sup>[23]</sup>.



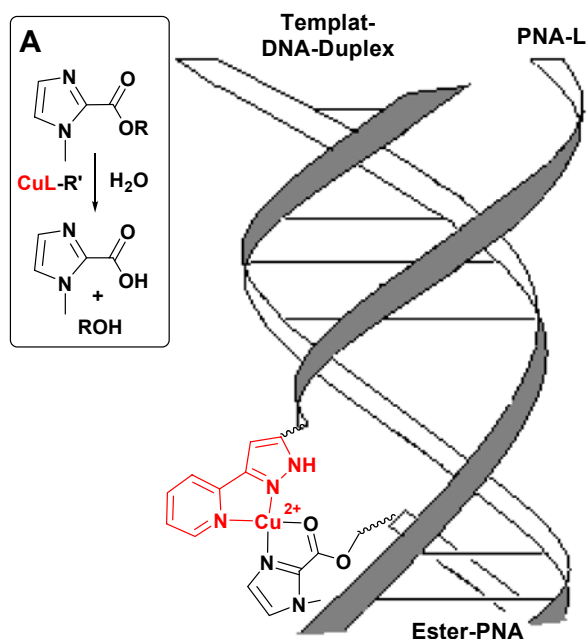
**Abb. 5:** Strukturvorschlag für den S: CuL-Komplex, der sich beim Mischen von S-Linker-PNA, PNA-LCu und Templat-DNA bildet und für die Aktivierung der Estergruppe (S) für die Hydrolyse verantwortlich ist. Die Esterhydrolyse am DNA-Templat durch den  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplex ist in Ausschnitt A gezeigt.

Diese Art von Katalyse ist im allgemeinen effizienter und vielseitiger anwendbar als Organokatalysen. Die S-Linker-PNA und die PNA-LCu binden benachbarte Seiten am DNA-Templat, so daß die reaktiven Gruppen (S und LCu) einander angenähert werden, wodurch die Hydrolyse des Esters (S) beschleunigt wird. Die Geschwindigkeit der Templat-gesteuerten Hydrolyse kann durch Kürzung des Linkers zwischen Ester-Gruppe und PNA-Fragment von vier auf zwei Atome deutlich erhöht werden. In dieser Arbeit wurden weitere Strukturvariationen der S-Linker-PNA getestet. Im Besonderen wurde eine direkte Konjugation der Ester-Gruppe mit der PNA (kein Linker) und ein Austausch der  $\text{Cu}^{2+}$ -komplexierenden Gruppe (2-Pyridyl, S) durch eine Gruppe, die  $\text{Cu}^{2+}$  stärker bindet (N-Methyl-2-imidazolyl)<sup>[24]</sup>, untersucht. Letztere Modifikation könnte zu einer Stabilisierung des Komplexes S:CuL führen, der für die katalytische Ester-Hydrolyse verantwortlich ist, wodurch es zu einer Beschleunigung der Templat-gesteuerten Hydrolyse-Reaktion käme (**Abb. 5**). Basierend auf der Templat-gesteuerten Hydrolyse der optimierten S-Linker-PNAs wurde ein MALDI-TOF-massenspektrometrisches Experiment zur indirekten DNA-Analyse entwickelt. Die indirekte DNA-Analyse durch massenspektrometrische Detektion von PNA anstelle von DNA hat zwei wichtige Vorteile: Zum einen ist die Empfindlichkeit der massenspektrometrischen Methoden gegenüber PNA höher als gegenüber DNA; zum anderen ist es möglich Proben in biologischen Puffersystemen zu analysieren, die meist eine hohe Metallsalz-Konzentration aufweisen, wohingegen die direkte Analyse von DNA in Anwesenheit von Metallionen mit massenspektrometrischen Methoden nicht möglich ist. DNA-Analysenmethoden, die entweder auf PNA-DNA-Duplexbildung oder stöchiometrischen Reaktionen von PNAs am DNA-Templat beruhen, sind literaturbekannt<sup>[25]</sup>. Katalytische Reaktionen von PNAs, die durch katalytischen turnover zu einer höheren Empfindlichkeit führen könnten, wurden bis jetzt nicht zur DNA-Analyse verwendet.

Nicht nur der DNA-Einzelstrang kann als Templat für chemische Reaktionen dienen, sondern auch die Verwendung einer DNA-Duplex als Templat ist möglich. Dies hat bisher allerdings wenig Anwendung gefunden, obwohl Reaktionen, bei denen eine DNA-Duplex als Templat fungiert, durchaus interessant wären, da DNA in Zellen in Duplexform und nicht in Einzelstrangform vorliegt. Bisher wurden nur stöchiometrische Ligationsreaktionen an der DNA-Duplex untersucht, die eher langsam und mit schlechter Ausbeute ablaufen. So wurden

für die Carbonyldiimidazol-induzierte Kondensation von Pyrimidin-Oligonukleotiden am dsDNA-Templat in den meisten Fällen nur Ausbeuten um die 20 % erreicht<sup>[26]</sup>. Bei der Ligungsreaktion eines 3'-Hydroxyl-modifizierten Oligonukleotids mit einem aktivierten 5'-Phosphat-Oligonukleotid am Doppelstrang-Templat konnte im besten Fall eine Ausbeute von 40 % erhalten werden<sup>[27]</sup>.

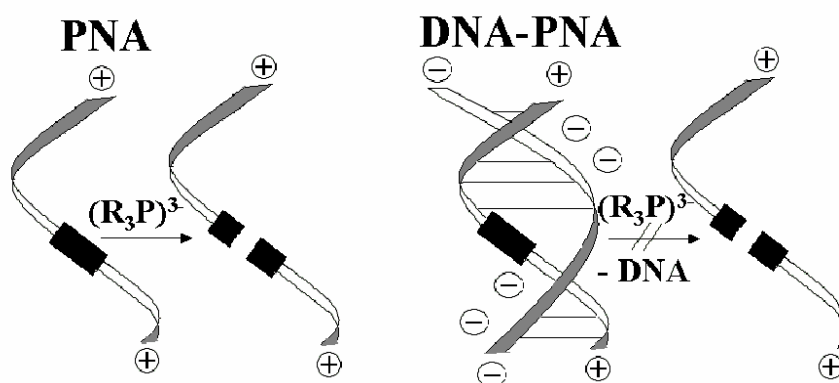
Wir haben hier nun die schon oben beschriebene Hydrolyse eines an eine PNA gebundenen Esters (in diesem Fall: N-Methyl-2-imidazolcarbonsäureester) (Ester-PNA) durch ein  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplex-PNA-Konjugat (PNA-LCu, **Abb. 6**) an der DNA-Duplex als Templat untersucht. Die Ester-PNA und die PNA-LCu binden hierbei an benachbarte Seiten der Templat-Duplex, wodurch die reagierenden Gruppen (Ester und LCu) einander angenähert werden und die Hydrolyse des Substrat-Esters beschleunigt wird. Dies geschieht analog zu der Ester-Hydrolyse am DNA-Einzelstrang, nur daß hier eine Triplex-Struktur gebildet wird. Dies ist die erste katalytische Spaltreaktion, die am Doppelstrang-DNA-Templat beobachtet wurde.



**Abb. 6:**  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplex-katalysierte Ester-Hydrolyse am Doppelstrang-DNA-Templat.

Reaktionen von Nucleinsäuren, die durch ihre komplementären Stränge nicht beschleunigt sondern inhibiert werden, können ebenfalls in der Analyse verwendet werden. So findet z. B. die selektive Spaltung von nicht-gebundener DNA, die durch Einzelstrang-spezifische Nucleasen<sup>[28]</sup> katalysiert wird, bei der massenspektrometrischen Detektion von PCR-amplifizierter DNA Anwendung<sup>[29]</sup>. Diese enzymatische Analysenmethode kann allerdings nicht für Nucleinsäure-Analoga, wie z. B. Peptidnucleinsäuren (PNAs)<sup>[30]</sup>, oder für mit großen Substituenten modifizierte Nucleinsäuren verwendet werden, da sie keine Substrate von Nucleasen sind. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist, daß für die Analyse eine Entsalzung der DNA notwendig ist.

Hier wurde nun eine nicht-enzymatische Reaktion untersucht, bei der die Spaltung einer intern mit einer Disulfid-Gruppe modifizierten PNA durch ein externes Reduktionsmittel durch komplementäre PNA stark inhibiert wird (**Schema 2**).



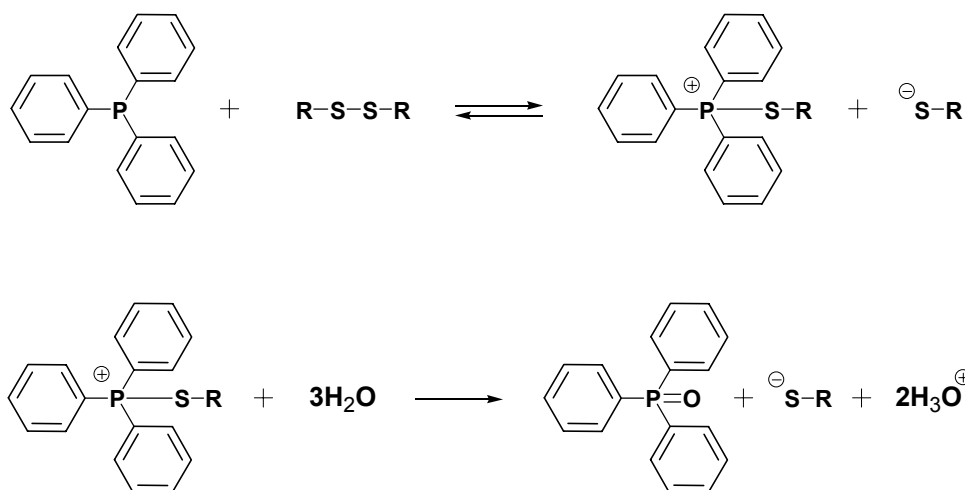
**Schema 2:** Spaltung einer in der Mitte einer PNA gelegenen Disulfidgruppe in Anwesenheit und Abwesenheit von komplementärer DNA.

Diese chemische Umsetzung kann als Analogon zur DNA-Spaltung durch Einzelstrang-spezifische Nucleasen angesehen werden; denn sowohl bei der chemischen als auch bei der enzymatischen Reaktion sind die Einzelstrang-Substrate aktiver. Diese Reaktion kann möglicherweise die Nuclease-katalysierte DNA-Hydrolyse in der Nucleinsäurenanalyse<sup>[27]</sup> ersetzen. Aufgrund der hohen Affinität und Selektivität von PNA bei der Bindung an Einzelstrang-DNA (ssDNA), haben auf PNA beruhende Analysenmethoden einige Vorteile, wie z. B. höhere Sequenzselektivität und die Möglichkeit PCR-amplifizierte DNA-Duplices direkt zu verwenden, anstelle von abgetrennten ssDNAs<sup>[31]</sup>. Außerdem können Experimente,

die auf PNA-DNA-Bindung basieren, unter salzfreien Bedingungen durchgeführt werden, was die Detektion erleichtert<sup>[30]</sup>.

Die Spaltung der S-S-Bindung durch Nucleophile, die dreiwertigen Phosphor enthalten, ist bereits seit ca. 150 Jahren bekannt<sup>[32][33]</sup>. Einige der besser untersuchten Beispiele behandeln unter anderem die Reaktion von Disulfiden mit Phosphinen<sup>[34][35]</sup>, Phosphiten<sup>[36][37]</sup> und Aminophosphinen<sup>[38]</sup> sowie die Reaktion von Phosphinen mit Metall-Dithiolat-Komplexen<sup>[39]</sup>. Quantitative Untersuchungen der relativen Reaktivität von Nucleophilen gegenüber Disulfiden weisen darauf hin, daß dreiwertige Phosphor-Nucleophile zu den stärksten Nucleophilen zählen<sup>[40]</sup>.

Die Kinetik der Spaltung der S-S-Bindung mit  $R_3P$  wurde im Detail untersucht<sup>[41]</sup>. Vor allem die Reaktion von Triphenylphosphin ( $Ph_3P$ ) mit  $R-SS-R'$  ergibt das entsprechende Triphenylphosphinoxid in quantitativer Ausbeute. Für diese Reaktion wurde ein Zweistufen-Mechanismus vorgeschlagen (**Abb. 7**).



**Abb. 7:** Mechanismus der Disulfidspaltung mit Triphenylphosphin.

In der ersten Stufe greift das Triphenylphosphin ein einzelnes Schwefelatom an, wobei das entsprechende Thiolat ( $R-S^-$ ) und ein Thiolphosphoniumkation gebildet werden. Sowohl bei hohem als auch bei niedrigem pH-Wert ist der erste Schritt geschwindigkeitsbestimmend, und die Reaktion verläuft nach zweiter Ordnung. Bei mittlerem pH-Wert wächst die Bedeutung der Reversibilität des ersten Schrittes, und die Reaktion wird insgesamt komplizierter. Entsprechend einem alternativen Mechanismus erfolgt der erste Angriff des dreiwertigen Phosphors gleichzeitig an beiden Schwefelatomen, wobei direkt fünfwertiger Phosphor als Intermediat gebildet wird. Dieser Mechanismus wurde allerdings inzwischen aufgrund der

Empfindlichkeit der Reaktion gegenüber dem Ionisierungsvermögen des Lösungsmittels und wegen des elektronischen Effektes der Substituenten verworfen. Substituenteneffekte sprechen dafür, daß im Übergangszustand beide Schwefelatome eine negative Ladung ausbilden.



## 2. Zielsetzung

Ziel der Arbeit war die Untersuchung und Optimierung der Metall-katalysierten Esterhydrolyse am DNA-Templat. Im besonderen sollte der Einfluß des Linkers zwischen Ester-Gruppe und PNA-Fragment auf die Geschwindigkeit der Esterspaltung erforscht werden. Als Template für die Reaktion sollten sowohl DNA-Einzelstränge als auch an DNA-Doppelstränge untersucht werden. Die Analyse des Reaktionsablaufs sollte mittels eines MALDI-TOF-Massenspektrometers erfolgen, was eine hohe Empfindlichkeit der Methode gewährleistet und auch die Möglichkeit bietet, Proben in biologischen Pufferlösungen zu analysieren.

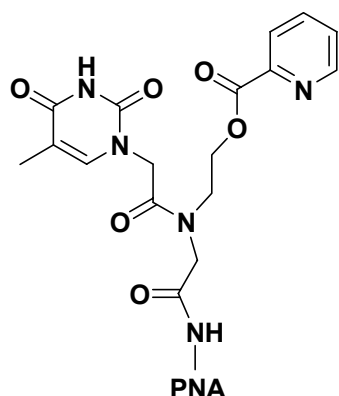
In einem weiteren Projekt sollte der Effekt komplementärer DNA auf die Disulfidspaltung einer intern modifizierten PNA untersucht werden. In der Einzelstrang-Form besitzt PNA (ssPNA) eine flexible, gefaltete Struktur, wohingegen die Struktur einer PNA-DNA-Duplex ausgedehnt und wohldefiniert ist. Daher liegt die Vermutung nahe, daß die Disulfid-Gruppe in der Mitte der PNA durch benachbarte funktionelle Gruppen unterschiedlich abgeschirmt wird, je nachdem, ob PNA frei oder an die Ziel-DNA gebunden vorliegt. Es ist außerdem anzunehmen, daß die Reaktivität von geladenen Reagenzien bei der Spaltung von positiv geladener ssPNA und von PNA, die in der PNA-DNA-Duplex vorliegt, unterschiedlich ist. Ziel dieser Arbeit war es, die Faktoren zu ermitteln, die die Reaktivität der Disulfid-PNA in freier und hybridisierter Form beeinflussen, und stark unterschiedliche Reaktivitäten zu erreichen.

Beide Methoden sollten vor allem unter dem Aspekt der Anwendung zur DNA-Sequenzanalyse untersucht werden.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1. Übersicht dargestellter Verbindungen

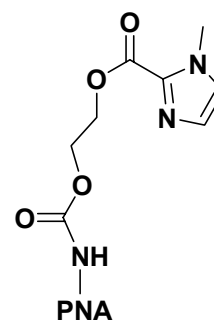
##### 3.1.1. N-modifizierte PNAs



6a: PNA - TCACA ACTA-Lys

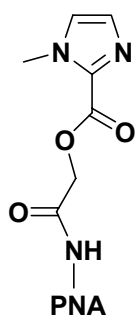
6b: PNA - CCTAATCACA ACTA-Lys

(Verbindungen 1-5: Zwischenstufen der Synthese von PNA 6.)



9: PNA - TCACA ACTA-Lys

(Verbindungen 7-8: Zwischenstufen der Synthese von PNA 9.)



11a-C: PNA - TCACA ACTA-Lys

11a-T: PNA - TCACA ACTA-Lys

11a-A: PNA - TCACA ACTA-Lys

11a-G: PNA - TCACA ACTA-Lys

11b-C: PNA - CTCGGCACT-Lys

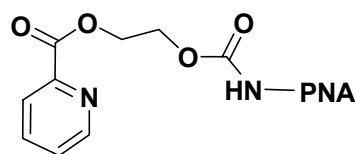
11b-T: PNA - CTCGGCACT-Lys

11b-A: PNA - CTCGGCACT-Lys

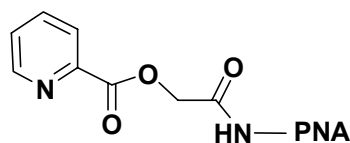
11b-G: PNA - CTCGGCACT-Lys

11c: PNA - TCTCTCTT-Lys

(Verbindung 10: Zwischenstufe der Synthese von PNA 11.)

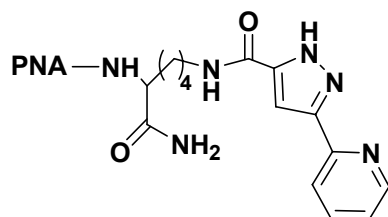


12<sup>Ref. 23</sup>: PNA - TCACA ACTA-Lys



13<sup>Ref. 23</sup>: PNA - TCACA ACTA-Lys

### 3.1.2. C-modifizierte PNAs

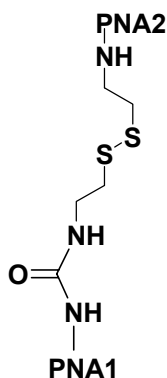


**16a**<sup>Ref. 23</sup>: PNA - LysGGATGGA

**16b**: PNA - LysTTTCCTCCCC

(Verbindungen 14-15: Zwischenstufen der Synthese von PNA 16.)

### 3.1.3. Intern modifizierte PNAs



**43a**: PNA1- AACTA-Lys, PNA2- Lys-CATGG

**43b**: PNA1 - TCACAACTA-Lys, PNA2- Lys-GGATGGA

**43c**: PNA1- TTGGCACT-Lys, PNA2- Lys-CATATTGC

(Verbindungen 17-39: DNAs, vgl. unten)

(Verbindungen 40-42: Zwischenstufen der Synthese von PNA 43.)

### 3.1.4. Verwendete DNAs

**DNA 17:** TAG TTG TGA TCC ATC C

**DNA 18:** TAG TTA TGA TCC ATC C

**DNA 19:** TAG TTT TGA TCC ATC C

**DNA 20:** TAG TTC TGA TCC ATC C

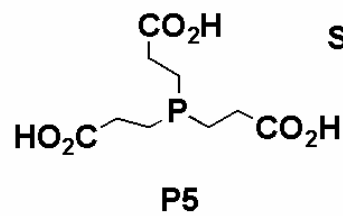
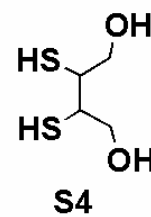
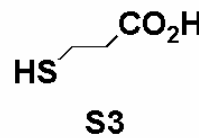
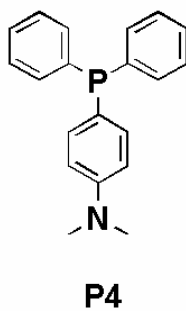
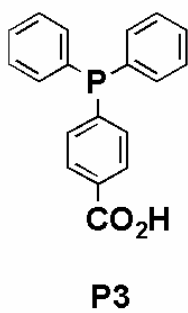
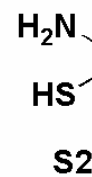
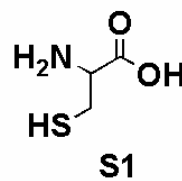
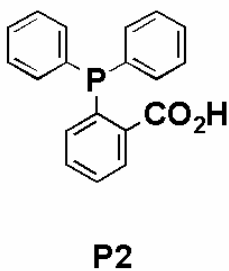
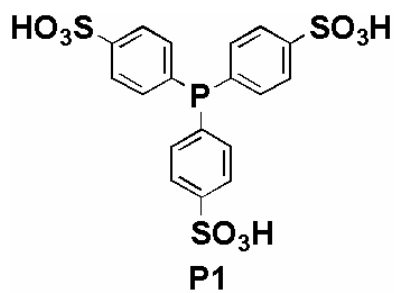
**DNA 21:** AGT GCC GAG TCC ATC C

**DNA 22:** AGT GCC AAG TCC ATC C

**DNA 23:** AGT GCC TAG TCC ATC C

DNA 24: AGT GCC GAG TCC ATC C  
 DNA 25: TAG TTG TGA GGG GAG GAA A  
 DNA 26: TAG TTA TGA GGG GAG GAA A  
 DNA 27: TAG TTTT TGA GGG GAG GAA A  
 DNA 28: TAG TTC TGA GGG GAG GAA A  
 DNA 29: TAG TTG TGA TTA GGT CCA TCC  
 DNA 30: TAG TTTT TGA TTA GGT CCA TCC  
 DNA 31: TAG TTG TTA TTA GGT CCA TCC  
 DNA 32: TAG TTG TGA TGA GGT CCA TCC  
 DNA 33: TAG TTG TGA TTA GGT CCC TCC  
  
 DNA 34: CGA CGA AGA GAG AGA GGG GAG GAA AGT AGG  
 DNA 35: CGA CGA AGA GAT AGA GGG GAG GAA AGT AGG  
 DNA 36: CGA CGA AGA GAG AGA GGG TAG GAA AGT AGG  
 DNA 37: CCT ACT TTC CTC CCC TCT CTC TCT TCG TCG  
 DNA 38: CCT ACT TTC CTA CCC TCT CTC TCT TCG TCG  
 DNA 39: CCT ACT TTC CTC CCC TCT ATC TCT TCG TCG  
  
 DNA 44: TAG TTC CAT G  
 DNA 44a: TAT TTC CAT G  
 DNA 44b: TAG TTC CCT G  
 DNA 44c: TAT TTC CCT G  
 DNA 44d: TAG TTTT CCA TG  
 DNA 44e: TAG TTTT TCC ATG  
 DNA 45: TAG TTG TGA TCC ATC C  
 DNA 45a: TAG TTG TGA TCC CTC C  
 DNA 45b: TAG TGG TGA TCC ATC C  
 DNA 46: AGT GCC AAG CAA TAT G  
 DNA 46a: AGT GAC AAG CAA TAT G  
 DNA 46b: AGT GCC AAG CAC TAT G

### 3.1.5. Verwendete Spaltreagenzien



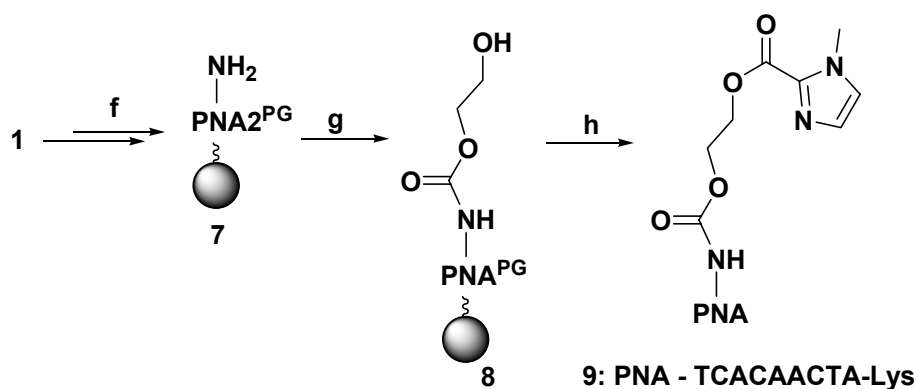
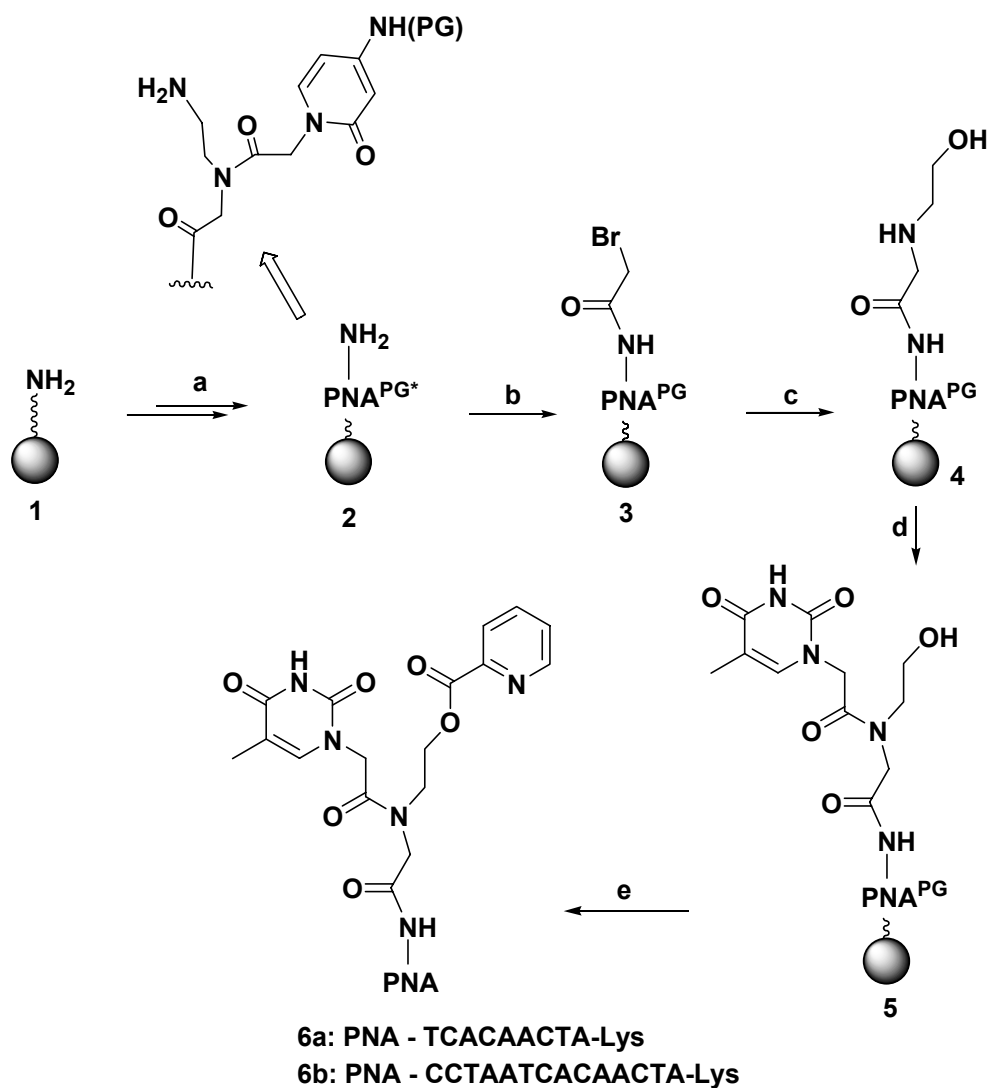
## 3.2. Metallkatalysierte Reaktionen am DNA-Templat

### 3.2.1. Synthesen

Die Geschwindigkeit der Hydrolyse der S-Linker-PNA am DNA-Templat wird von der Struktur des Linkers zwischen dem Picolinat-Fragment und dem N-Terminus der PNA beeinflusst. In der oben bereits erwähnten Veröffentlichung<sup>[23]</sup> wurden Linker mit 4 und 2 Atomen untersucht. Wir haben nun eine PNA synthetisiert, die eine Alkohol-Gruppe an der Stelle der N-terminalen Amino-Gruppe besitzt, PNA **5** (**Schema 3**), um ein System testen zu können, das ein Ester-Fragment enthält, welches direkt an die PNA gebunden ist (kein Linker). Die Synthese ging von der Herstellung der PNA **2** aus, die gemäß dem Standard-Festphasen-Synthese-Protokoll dargestellt wurde. Anschließend wurde der N-Terminus der PNA **2** mit Bromactetyl bromid modifiziert, wodurch eine Bromalkyl-Gruppe eingeführt wurde, die dann mittels Aminoethanol aminiert wurde. Der so erhaltene Alkylaminoalkohol (PNA **4**) wurde dann nach Aktivierung mit einer Mischung aus HBTU, HOBT und DIEA durch 1-N-Thyminessigsäure O- und N-acyliert<sup>[42]</sup>. Die O-Acyl-Gruppe des diacylierten Produktes wurde durch konzentrierten wäßrigen Ammoniak selektiv hydrolysiert, wobei PNA **5** entstand (Ausbeute > 90 % für die Schritte b-d, ausgehend von PNA **2**). Durch Kopplung von mit DIC aktivierter Picolinsäure, anschließende Entschützung und Abspaltung von der Festphase mit einer TFA / m-Cresol-Mischung und HPLC-Reinigung des erhaltenen Konjugats konnte eine PNA synthetisiert werden, die eine Ester-Gruppe enthält, welche direkt an den modifizierten PNA-Terminus gebunden ist (PNAs **6a** und **6b**).

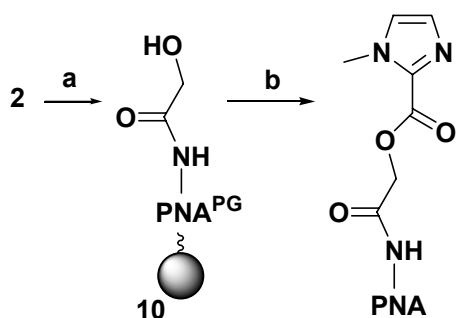
Außerdem wurde in den literaturbekannten Konjugaten **12** und **13** das Picolyl-Fragment durch ein 1-N-Methyl-2-imidazolyl-Fragment substituiert, um zu untersuchen, ob die Donor-Eigenschaften der Cu<sup>2+</sup>-bindenden Gruppe die Geschwindigkeit der Templat-gesteuerten Ester-Hydrolyse beeinflussen. Diese Derivate (PNAs **9**, **11a** und **11b**) wurden durch Acylierung der HO-Linker-PNAs **8** und **10** mit DIC-aktivierter 1-N-Methyl-2-imidazolylcarbonsäure synthetisiert (**Schemata 3, 4**).

Des Weiteren wurden die C-terminal modifizierten PNA-Konjugate **16a** und **16b** synthetisiert<sup>[21]</sup>, die bei der Ester-Hydrolyse als PNA-L verwendet wurden. Hierzu wurde zunächst Fmoc- und Alloc-geschütztes Lysin an die Festphase gekoppelt. Nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe durch Piperidin, wurde die so erhaltene freie Aminogruppe mit einer Mischung aus HBTU, HOBT und DIEA aktiviert und mit 2-(5-Carboxypyrazolyl)-pyridin

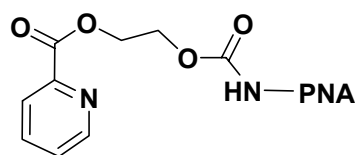


**Scheme 3:** Synthesen der am N-Terminus mit einer Ester-Gruppe modifizierten Peptidnukleinsäuren.

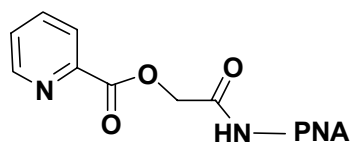
a), f) PNA Synthese; b)  $\text{BrCH}_2\text{C}(\text{O})\text{Br}$ , DIEA; c)  $\text{HO}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ , DIEA; d) 1. 1-N-Thyminessigsäure, HBTU, HOBT, DIEA, 2.  $\text{NH}_3$  aq; e) 1. Picolinsäure, DIC, DMAP, 2. TFA, m-Cresol; g) 1. CDI, 2.  $\text{HO}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$ , NaH; h) 1. 1-N-Methyl-2-imidazolyl-carbonsäure, DIC, DMAP, 2. TFA, m-Cresol.



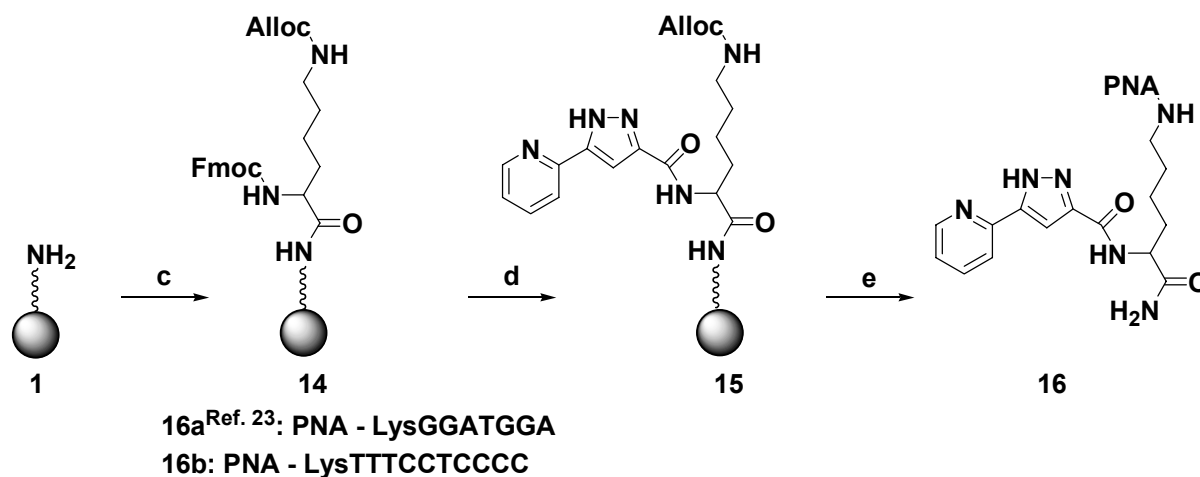
11a-C: PNA - TCACAACTA-Lys  
 11a-T: PNA - TCATAACTA-Lys  
 11a-A: PNA - TCAAAACTA-Lys  
 11a-G: PNA - TCAGAACTA-Lys  
 11b-C: PNA - CTCGGCACT-Lys  
 11b-T: PNA - CTTGGCACT-Lys  
 11b-A: PNA - CTAGGCACT-Lys  
 11b-G: PNA - CTGGGCACT-Lys  
 11c: PNA - TCTCTCTCTT-Lys



12<sup>Ref. 23</sup>: PNA - TCACAACTA-Lys



13<sup>Ref. 23</sup>: PNA - TCACAACTA-Lys



16a<sup>Ref. 23</sup>: PNA - LysGGATGGA  
 16b: PNA - LysTTTCCTCCCC

**Schema 4:** Synthesen der am N-Terminus mit einer Ester-Gruppe modifizierten Peptidnukleinsäuren und der am C-Terminus modifizierten Katalysator-Peptidnukleinsäuren.

a) 1. AcOCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H, HBTU, HOBT, DIEA, 2. NH<sub>3</sub> aq; b) 1. 1-N-Methyl-2-imidazolyl-carbonsäure, DIC, DMAP, 2. TFA, m-Cresol.

c) 1. Fmoc-Lys(Alloc)-OH, HBTU, HOBT, DIEA; d) 1. PNA-deblock-solution (Piperidin / DMF), 2. 2-(5-Carboxypyrazolyl)-pyridin, HBTU, HOBT, DIEA; e) 1. Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, PPh<sub>3</sub>, (H<sub>2</sub>NEt<sub>2</sub>)(HCO<sub>3</sub>), 2. PNA-Synthese, 3. TFA, m-Cresol.



umgesetzt. Anschließend wurde die Alloc-Schutzgruppe mit einer Mischung aus Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0), Triphenylphosphin und Diethylammoniumhydrogencarbonat abgespalten. An die nun entstandene freie Aminofunktion wurde dann mit Hilfe des Syntheseautomaten die PNA geknüpft.

Die so erhaltenen Konjugate wurden mittels einer TFA / m-Cresol-Mischung von der Festphase abgespalten, entschützt und abschließend HPLC-gereinigt.

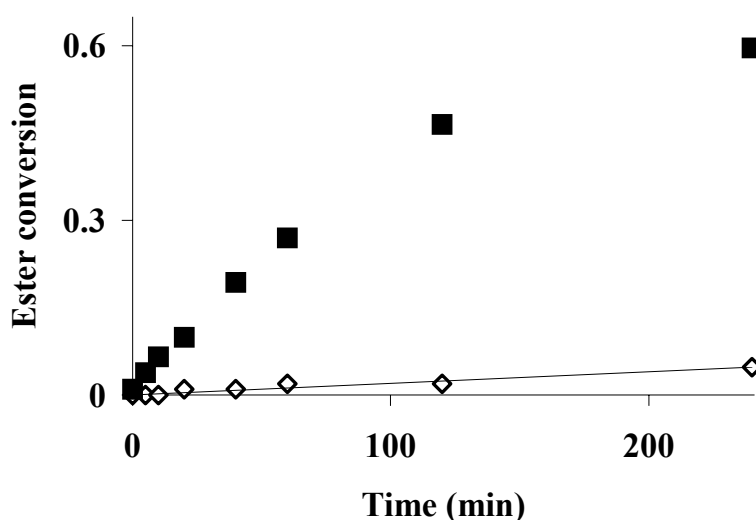
### 3.2.2. Optimierung der Templat-gesteuerten Hydrolyse-Reaktion

Einige Übergangsmetalle sind dafür bekannt, die Hydrolyse von Metall-komplexierenden Donor-Gruppen zu beschleunigen, die Ester-Gruppen enthalten, wie z. B. Picolinsäureester und Aminosäureester<sup>[43]</sup>. Die Hydrolyse von PNA **12** (1  $\mu$ M) durch  $M^{2+}$ -PNA **16a** (1  $\mu$ M) am DNA-Templat wurde bei pH 7 (MOPS 10 mM, NaCl 50 mM) in Anwesenheit verschiedener Metall-Ionen getestet:  $M^{2+} = Cu^{2+}$  ( $CuSO_4$ ),  $Ni^{2+}$  ( $NiSO_4$ ),  $Zn^{2+}$  ( $ZnCl_2$ ) und  $Pd^{2+}$  ( $Pd(O_2CCH_3)_2$ ). Von all diesen Metall-Ionen, mit Ausnahme des  $Zn^{2+}$ -Ions, ist bei  $\mu$ molaren Konzentrationen eine stabile Komplexbildung mit der PNA **16a** zu erwarten, da bei diesen Bedingungen die korrespondierenden  $M^{2+}$ -PNA **16a**-Komplexe mit Hilfe von MALDI-TOF Massenspektrometrie detektierbar sind. Die PNA-Proben, die komplementäre DNA, der Puffer und die Metall-Ionen wurden bei Raumtemperatur 60, 120 min und 24 h vor der Analyse zusammengegeben.

$Zn^{2+}$  und  $Pd^{2+}$  beschleunigen die Hydrolyse von PNA **12** am DNA-Templat im Vergleich zu der Hydrolyse in Abwesenheit des Templats nicht sonderlich.  $Cu^{2+}$  und  $Ni^{2+}$  hingegen sind  $\sim 10$ -mal so aktiv wie die vorher genannten Metall-Ionen und beschleunigen die Hydrolyse beachtlich. Außerdem wurde festgestellt, daß die Hintergrund-Hydrolyse in Anwesenheit von  $Ni^{2+}$  wesentlich schneller abläuft, was vermutlich auf einer geringen Bindungsaffinität des  $Ni^{2+}$  zur PNA **16a** beruht. Deshalb wurden alle weiteren Experimente mit  $Cu^{2+}$ -Ionen durchgeführt. Die Templat-gesteuerte Hydrolyse in Anwesenheit von  $Cu^{2+}$  ist bei Raumtemperatur sehr langsam, in 24 h entstehen weniger als 5 % Produkt. Als optimale Temperatur für die Reaktion wurden 35 °C ermittelt. Bei diesen Bedingungen ist die Hydrolyse des Picolinsäureesters am DNA-Templat schnell, wohingegen die Hintergrundreaktion ohne DNA-Templat noch sehr langsam ist. Des weiteren ist die Anwesenheit von  $> 50$  mM NaCl erforderlich, um eine ausreichende

Austauschgeschwindigkeit des Hydrolyse-Produktes durch intakte S-Linker-PNA zu gewährleisten. In Abwesenheit von NaCl unterliegt die Reaktion einer starken Produktinhibierung, was sehr wahrscheinlich auf einen langsamen Austausch zurückzuführen ist.

Die Spaltung der S-Linker-PNAs durch die PNA-LCu wird durch katalytische Mengen des DNA-Templats stark beschleunigt (**Abb. 8**). Das Verhältnis der Geschwindigkeiten von katalysierter zu Hintergrund-Hydrolyse ( $v_0^{\text{cat}} / v_0^{\text{uncat}}$ ) ist für die PNAs **6a** (kein Linker zwischen Ester-Gruppe und PNA) und **12** (4-atomiger Linker) ähnlich und kleiner als das  $v_0^{\text{cat}} / v_0^{\text{uncat}}$ -Verhältnis, das für die PNA **13** (2-atomiger Linker) gefunden wurde (**Tab. 1**).



**Abb. 8:** Hydrolyse der PNA **6a** (5  $\mu\text{M}$ ) durch  $\text{Cu}^{2+}$ - PNA **16a** (1  $\mu\text{M}$ ) in Anwesenheit (ausgefüllte Quadrate) und Abwesenheit (offene Rauten) von DNA **17** (1  $\mu\text{M}$ ). 10 mM MOPS pH 7, NaCl 50 mM. Die PNA- und DNA-Sequenzen und Nummerierung sind den **Schemata 3-5** zu entnehmen.

Außerdem liegen die Schmelzpunkte  $T_m$ 's der Duplices **6a:17** und **12:17** 3,5-7,1  $^\circ\text{C}$  tiefer als die der **13:17**-Duplex (**Tab.1**). Trotzdem liegen diese  $T_m$ 's immer noch  $> 12$   $^\circ\text{C}$  über der Temperatur, die für die Hydrolyse-Reaktion am DNA-Templat benutzt wird, was darauf hindeutet, daß die Bildung der Duplices bei diesen Bedingungen vollständig ist. Es ist bekannt, daß die Bewegung molekularer Fragmente mit helikalen Strukturen bei Temperaturen nahe am Schmelzpunkt zunimmt. Dieser Effekt ist bei den Duplex-Enden besonders stark ausgeprägt. Solche Bewegungen destabilisieren die Struktur des S:CuL-Komplexes, der an DNA-Templaten gebildet wird, weshalb davon auszugehen ist, daß sie die Geschwindigkeit der Templat-gesteuerten Hydrolyse-Reaktion verringern.

**DNA 17: TAGTTGTGATCCATCC**  
**DNA 18: TAGTTATGATCCATCC**  
**DNA 19: TAGTTTTGATCCATCC**  
**DNA 20: TAGTTCTGATCCATCC**  
**DNA 21: AGTGCCGAGTCCATCC**  
**DNA 22: AGTGCCAAGTCCATCC**  
**DNA 23: AGTGCCTAGTCCATCC**  
**DNA 24: AGTGCCCAGTCCATCC**  
**DNA 25: TAGTTGTGAGGGGAGGAAA**  
**DNA 26: TAGTTATGAGGGGAGGAAA**  
**DNA 27: TAGTTTTGAGGGGAGGAAA**  
**DNA 28: TAGTTCTGAGGGGAGGAAA**  
**DNA 29: TAGTTGTGATTAGGTCCATCC**  
**DNA 30: TAGTTTTGATTAGGTCCATCC**  
**DNA 31: TAGTTGTTATTAGGTCCATCC**  
**DNA 32: TAGTTGTGATGAGGTCCATCC**  
**DNA 33: TAGTTGTGATTAGGTCCCTCC**

**Schema 5:** Sequenzen und Nummerierung der DNAs.

Es ist anzunehmen, daß sich diese Destabilisierung für die Duplices **6a:17** und **12:17** stärker auswirkt, da diese niedrigere Schmelzpunkte besitzen. Ein anderer Grund für die beobachteten Unterschiede der  $v_0^{\text{cat}} / v_0^{\text{uncat}}$ -Werte könnte sein, daß der 2-atomige Linker der PNA **13** optimal zur Bildung des S:CuL-Komplexes am DNA-Templat paßt. Bei PNA **12** hingegen, die einen längeren Linker besitzt, ist dieser Komplex aufgrund eines Entropieverlustes destabilisiert.

Bei PNA **6a**, die einen kürzeren Linker besitzt, kommt es durch einen Enthalpieverlust zu einer Destabilisierung dieses Komplexes. Der Schmelzpunkt  $T_m$  der **6a:17**-Duplex läßt sich durch Auswählen einer anderen PNA-Sequenz steuern. Wir haben die 14-mer PNA **6b** ausgewählt, um einen deutlichen Anstieg des Schmelzpunktes der korrespondierenden PNA : DNA-Duplex zu gewährleisten, der in diesem Fall +17,3 °C betrug (**Tab. 1**). Überraschenderweise sind die Geschwindigkeiten der Templat-gesteuerten Hydrolyse der PNA **6b** und der kürzeren PNA **6a** praktisch identisch (**Tab. 1**). Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, daß der Linker in der S-Linker-PNA die Hydrolyse-Reaktion am DNA-Templat direkt über Stabilisierung / Destabilisierung des Komplexes S:CuL beeinflusst, und nicht indirekt über Stabilisierung / Destabilisierung der S-Linker-PNA : DNA - Duplices. Durch Substitution des 2-Pyridyl-Fragments in PNA **12** und **13** durch ein N-Methyl-2-imidazolyl-Fragment (PNAs **9**, **11a**, **11b**) wird die Geschwindigkeit der DNA-Templat-gesteuerten Reaktion nicht signifikant geändert.

**Tab. 1:** Optimierung des Signal-Hintergrund-Verhältnisses für die DNA-Templat-gesteuerte Ester-PNA-Hydrolyse.

S-Linker-PNA/ PNA-LCu/DNA	Anchor <sup>a</sup>	Linker	$v_0^{\text{cat}}/$ $v_0^{\text{uncat}}$ <sup>b</sup>	$T_m$ (°C) <sup>c</sup>
<b>11a-C/Cu-16a/17</b>	Im	-CH <sub>2</sub> C(O)-	487	55.0 ± 1.4
<b>9a/Cu-16a/17</b>	Im	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OC(O)-	145	51.2 ± 1.5
<b>6a/Cu-16a/17</b>	Py	-	118	47.1 ± 1.3
<b>6b/Cu-16a/29</b>	Py	-	112	64.4 ± 0.4
<b>6b/Cu-16a/30</b>	Py	-	84	-
<b>6b/Cu-16a/31</b>	Py	-	42	-
<b>6b/Cu-16a/32</b>	Py	-	42	-
<b>6b/Cu-16a/33</b>	Py	-	1	-
<b>13/Cu-16a/17</b>	Py	-CH <sub>2</sub> C(O)-	485 <sup>Ref 21</sup>	54.2 ± 1.6
<b>12/Cu-16a/17</b>	Py	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OC(O)-	150 <sup>Ref 21</sup>	50.7 <sup>Ref 21</sup>

<sup>a</sup> Anchors: Im: N-Methyl-2-imidazolyl. Py: 2-Pyridyl. <sup>b</sup> Zur Berechnung der  $v_0^{\text{cat}}/v_0^{\text{uncat}}$ -Werte wurden die Anfangsgeschwindigkeiten verwendet; die Standardabweichung dieser Werte beträgt weniger als ± 10 %. <sup>c</sup> [S-Linker-PNA]= [PNA-LCu]= [DNA]= 2 μM, 10 mM MOPS pH 7, NaCl 50 mM. PNA- und DNA-Sequenzen und Nummerierungen sind den **Schemata 3-5** zu entnehmen.

In der schon erwähnten Publikation<sup>[23]</sup> wurde berichtet, daß die anfängliche Spaltungsgeschwindigkeit durch ein einzelnes „mismatch“ (eine einzelne Fehlbasenpaarung) in den Duplices **12:17** und **16a:17** um das 7-15-fache reduziert wird, was bedeutend schlechter ist als der Unterschied zwischen Hydrolyse in Anwesenheit und Abwesenheit des Templats,  $v_0^{\text{cat}}/v_0^{\text{uncat}} > 100$ . Das weist darauf hin, daß zumindest ein Teil der „mismatch“-DNAs an den Katalysator und das Substrat bindet. Obwohl ein einzelnes „mismatch“ in PNA:DNA-Duplices deren Stabilität normalerweise schon deutlich verringert, hängt die Größe dieses Effektes von der Stelle des „mismatch“ ab<sup>[44]</sup>. Theoretisch ist es möglich, in Abhängigkeit von der „mismatch“-Position eine „single-mismatch“-Diskriminierung zu erreichen, die mit den  $v_0^{\text{cat}}/v_0^{\text{uncat}}$ -Werten übereinstimmt. Das wäre dann der Fall, wenn die gesamte „mismatch“-DNA nicht an ihre Ziel-PNA gebunden ist, während die komplementäre DNA vollständig gebunden ist. Es konnte gezeigt werden, daß eine solche Selektivität in der Templat-gesteuerten, Metall-Komplex-katalysierten Reaktion durch Variation der „mismatch“-Position

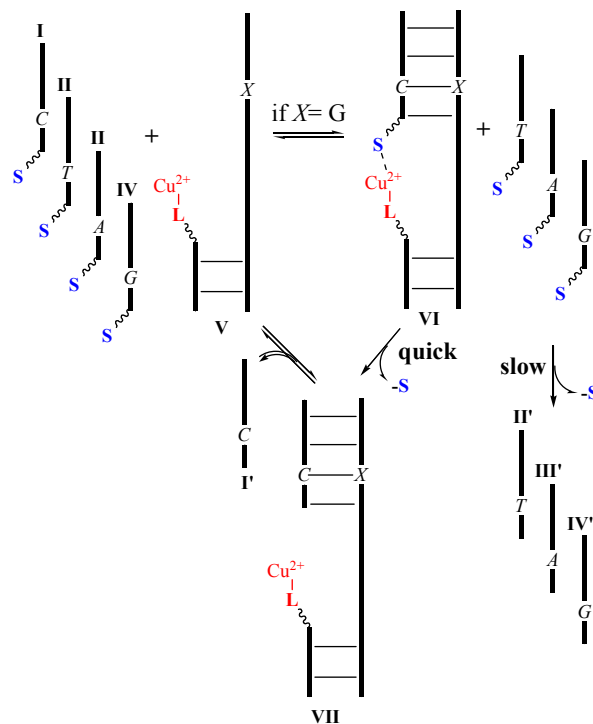
in der Templat-DNA erreicht werden kann. Die Hydrolyse der PNA **6b** wurde in Anwesenheit der DNAs **30-33** durchgeführt, die einzelne „mismatches“ an verschiedenen Positionen enthalten (**Tab. 1**). Die am stärksten Duplex-destabilisierende Wirkung wurde bei DNA **29**, A18 → C18, festgestellt, bei der das „mismatch“ gegenüber der PNA-LCu liegt; die korrespondierend mutierte DNA **33** hingegen reagiert überhaupt nicht als Templat in der Hydrolyse von PNA **6b** ( $v_0^{\text{cat}} / v_0^{\text{uncat}} = 1$ ). Dies stimmt mit einer 112-fachen „single-mismatch“-Diskriminierung überein. Das natürliche Enzym T4 DNA Ligase erreicht bei optimalen Bedingungen eine  $10^2$ -fache Diskriminierung<sup>[45]</sup> und die selektivere *Tth* Ligase aus *Thermus thermophilus* eine  $\sim 10^3$ -fache<sup>[46]</sup>. In chemischen Ligationen von DNA-Proben an Nukleinsäure-Templates wurde eine  $\sim 10^4$ -fache Diskriminierung von einzelnen „mismatches“ erreicht<sup>[20]</sup>, während bei Ligationen von PNA-Proben eine  $\sim 10^2$ -fache Diskriminierung erzielt werden kann<sup>[25c]</sup>.

Die Templat-gesteuerte Hydrolyse-Reaktion kann potentiell durch zusätzliche  $\text{Cu}^{2+}$ -bindende Liganden, die mit dem Ester-Substrat um freie Koordinationsstellen am Metall-Ion konkurrieren, inhibiert werden. Das könnte bei der Detektion von nicht aufgereinigten Nukleinsäuren, die durch PCR oder direkt aus biologischen Proben erhalten wurden, zu einer deutlichen Limitierung führen, wenn die Analysenmethode auf Metall-Komplexen beruht. Solche Proben können Nukleotidtriphosphat-, Phosphat- und Chlorid-Anionen enthalten, die allesamt dazu in der Lage sind,  $\text{Cu}^{2+}$  zu binden und dessen katalytische Aktivität zu inhibieren, wenn sie in hohen Konzentrationen vorliegen. Des Weiteren kann durch hohe Konzentration an Natrium- oder Kalium-Ionen die direkte Analyse der Proben durch massenspektrometrische Methoden behindert werden. Daher wird in literaturbekannten Analysemethoden zur Detektion von DNA durch Massenspektrometrie normalerweise eine Aufreinigungsstufe vorgeschaltet<sup>[25c], [17], [47]</sup>. Überraschenderweise funktioniert die hier berichtete Ester-Hydrolyse-Reaktion am DNA-Templat sowohl in typischem PCR-Puffer (ATP 200  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MgCl}_2$  1,5 mM, KCl 50 mM), als auch in physiologischem Puffer (Phosphat-Puffer 10 mM pH 7, NaCl 150 mM). Dies läßt sich eventuell durch die außerordentlich hohe Stabilität des Komplexes S:CuL erklären, die vermutlich ein Resultat der Vororganisation der korrespondierenden Liganden am DNA-Templat ist (**Abb. 5**). Das stimmt mit der Tatsache überein, daß die DNA-Templat-gesteuerte Reaktion von bis zu zwei Äquivalenten des Hydrolyse-Produktes, Picolinsäure bzw. N-Methyl-2-imidazolylcarbonsäure, nicht wesentlich inhibiert wird (**Abb. 8**), obwohl dieses eine merkbar höhere Affinität zu  $\text{Cu}^{2+}$  aufweist als der entsprechende Ester. Außerdem wird die Geschwindigkeit der Ester-Hydrolyse am DNA-Templat durch Substitution des 2-Pyridyl-Fragments durch N-Methyl-2-imidazolyl<sup>[24]</sup>,

welches  $\text{Cu}^{2+}$  stärker bindet, nicht beeinflusst. Das weist darauf hin, daß  $\text{Cu}^{2+}$  schon in dem Assoziat **VI** (**Abb. 9**) vollständig gebunden vorliegt, welches die Picolyester-PNA in den Konzentrationen enthält, die für die Versuche verwendet wurden.

### 3.2.3. Detektion von einzelnen Nukleotid-Variationen in DNA mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie

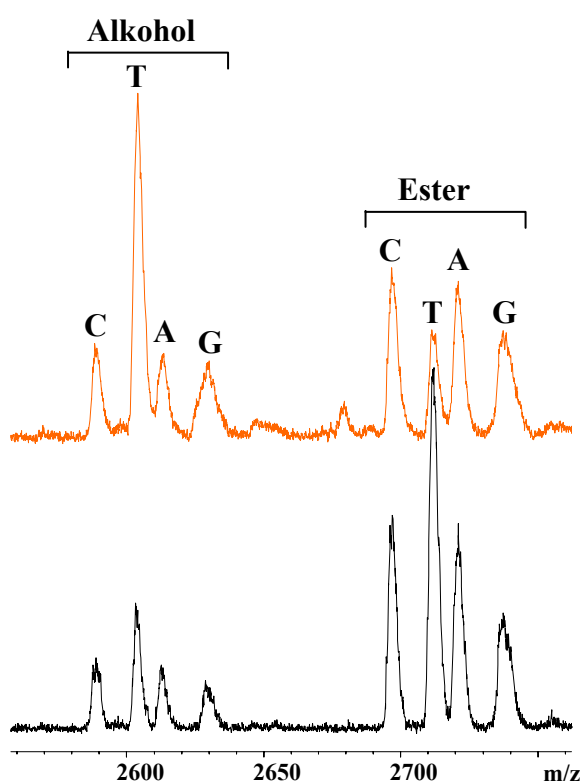
MALDI-TOF-Massenspektrometrie ist eine hoch empfindliche und milde Methode zur Analyse von kurzen DNA- und PNA-Proben. Der Time-of-flight (TOF)-Detektor bietet eine hervorragende Auflösung. Einfach geladene Metall-Ionen werden üblicherweise detektiert, wohingegen Peaks der korrespondierenden zweifach geladenen Spezies und einfach geladener Dimere in der Gasphase eine geringe Intensität besitzen. Daher erhält man für jede Komponente einer Mischung einen einzelnen Peak im Massenspektrum<sup>[48]</sup>.



**Abb. 9:** Anwendung der DNA-Templat-gesteuerten Esterhydrolyse bei der sequenzspezifischen DNA-Detektion.

Verbindungen **I-IV**: S-Linker-PNAs, die sich nur an einer einzigen Stelle im PNA-Strang unterscheiden (C, T, A oder G als Nukleobase); Ester-Gruppen sind als S gekennzeichnet und der PNA-Strang ist als Strich dargestellt. Assoziat **V** ist eine Duplex aus der Templat-DNA (als Strich mit X dargestellt, das für eine unbekannte Nukleobase steht) und einer PNA-LCu (Katalysator). Das Templat ist nur zu einer der PNAs **I-IV** komplementär. Die komplementäre PNA bildet mit **V** das Assoziat **VI** (am Beispiel von PNA **I** gezeigt), in dem der Ester (S) durch Koordination an Cu<sup>2+</sup>-L aktiviert ist und schnell durch Wasser hydrolysiert wird.

Die MALDI-TOF-Massenspektrometrie fand in letzter Zeit Anwendung zur quantitativen Analyse von DNA<sup>[49]</sup>, PNA<sup>[23]</sup> und Antibiotika<sup>[50]</sup>. Diese Faktoren machen die MALDI-TOF-Massenspektrometrie zur Methode der Wahl bei der Analyse von komplizierten Mischungen. Von allen untersuchten S-Linker-PNAs zeigte PNA **11a-C**, bei der ein N-Methyl-2-imidazolyl-Fragment durch einen 2-atomigen Linker an den N-Terminus der PNA gekoppelt ist, die beste Selektivität ( $v_0^{\text{cat}} / v_0^{\text{uncat}}$ ) in der Templat-gesteuerten Hydrolyse-Reaktion. Dieses PNA-Konjugat und seine Analoga wurden in weiteren massenpektrometrischen Versuchen getestet. Im Standardversuch wurde eine Mischung von vier S-Linker-PNAs (**I-IV**, **Abb. 9**), die sich nur an einer einzelnen Stelle im PNA-Strang voneinander unterscheiden (C, T, A oder G als Nukleobase), mit einer katalytischen Menge von Assoziat **V** (0,2 eq) zur Reaktion gebracht. Letzteres ist eine Duplex aus der PNA-LCu und einem DNA-Templat und ist zu einer der S-Linker-PNAs komplementär. Diese komplementäre S-Linker-PNA bindet an das Assoziat **V** unter Bildung von **VI**, wobei ihre Estergruppe durch intramolekulare Aktivierung durch den  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplex der PNA-LCu hydrolysiert wird.



**Abb. 10:** MALDI-TOF-Massenspektrum einer Mischung von S-Linker-PNAs **11a-C**, **T**, **A**, **G** (jeweils 5  $\mu\text{M}$ ), Katalysator  $\text{Cu}^{2+}$ -PNA **16a** (1  $\mu\text{M}$ ) mit (orangenes Spektrum) und ohne (schwarzes Spektrum) Templat-DNA **18** (1  $\mu\text{M}$ ), aufgenommen 60 min nach dem Zusammengeben der Komponenten. Während der Hydrolyse-Reaktion werden die S-Linker-PNAs (im MS mit „Ester“ gekennzeichnet) in Alkohole (Peaks als „Alkohol“ gekennzeichnet) überführt. 10 mM MOPS pH 7, NaCl 50 mM. PNA- und DNA-Sequenzen und Nummerierungen sind den **Schemata 3-5** zu entnehmen.



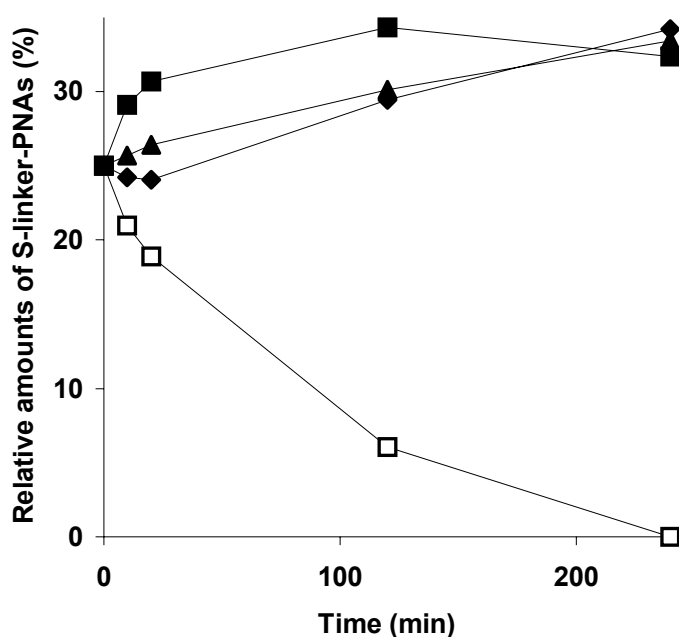
Die „mismatch“-S-Linker-PNAs werden durch weniger effiziente intermolekulare Aktivierung durch den  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplex langsamer hydrolysiert. Auf der Basis dieser unterschiedlichen Reaktivitäten ist eine Sequenzbestimmung der zu analysierenden (Templat-)DNA möglich.

Die MALDI-TOF-Massenspektren von Mischungen, die die vier S-Linker-PNAs **11a-C**, **T**, **A**, **G** und die Katalysator- $\text{Cu}^{2+}$ -PNA **16a** mit und ohne DNA **18**, die zu PNA **11a-T** komplementär ist, enthalten, sind in **Abb. 10** dargestellt. Die Spektren wurden 60 min nach Zusammengeben der erwähnten Komponenten aufgenommen. Erwartungsgemäß wird PNA **11a-T** in Anwesenheit des Templats deutlich schneller gespalten als die anderen PNAs, während in Abwesenheit des Templats alle Substrate mit ähnlicher Geschwindigkeit gespalten werden. Werden anstelle von DNA **18** andere Templat-DNAs verwendet (**17**, **19**, **20**), wird die jeweils entsprechende komplementäre PNA bevorzugt gespalten. Dieser Versuch konnte mit weiteren S-Linker-PNAs (**11b-C**, **T**, **A**, **G**) und den korrespondierenden Templat-DNAs **21-24** reproduziert werden, was darauf hindeutet, daß die Methode allgemein anwendbar ist. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß die PNA-Sequenz der PNA-LCu keine Rolle spielt, solange das Konjugat vollständig an das DNA-Templat bindet. So ist z. B. die Hydrolyse von PNA **11a**-Mischung durch  $\text{Cu}^{2+}$ -PNA **16b** in Anwesenheit einer der Templat-DNAs **25-28** genauso effizient und selektiv wie die durch  $\text{Cu}^{2+}$ -PNA **16a** in Anwesenheit einer der Templat-DNAs **17-20**. Die Änderungen der relativen Konzentrationen der S-Linker-PNAs **11a-C**, **T**, **A**, **G** während der Templat-gesteuerten Ester-Hydrolyse wurden über die Flächen der korrespondierenden Peaks im Massenspektrum bestimmt. Die Hydrolyse von PNA **11a-T** am DNA-Templat ist nach 4 h komplett, was 5 „turnovers“ entspricht (**Abb. 11**).

Wie erwartet sind die relativen Mengen der S-Linker-PNAs in Abwesenheit irgendeiner Templat-DNA während der ersten 4 h der Hydrolyse weitestgehend konstant; nur eine leichte Abnahme der Menge von PNA **11a-G** ist zu beobachten (**Abb. 12**). Dieser Effekt ist durch Ausfallen eben dieser PNA zu erklären.

In verdünnten Lösungen nimmt die Reaktionszeit der Templat-gesteuerten Hydrolyse zu, wodurch das Ausfallen von PNA **11a-G** zu einem ernstem Problem wird. Nichtsdestotrotz ist DNA-Detektion durch Analyse der Intensitäten der Produkte der Hydrolyse-Reaktion immer noch möglich, da diese besser wasserlöslich sind (**Abb. 13**).

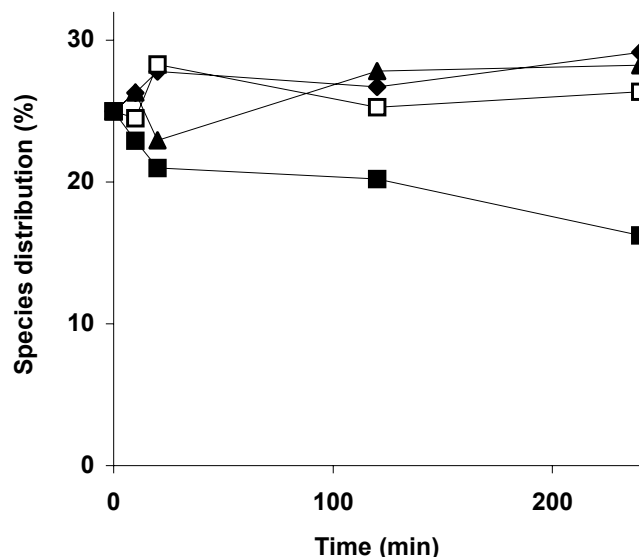
Die Empfindlichkeit der auf der Templat-gesteuerten Hydrolyse-Reaktion beruhenden DNA-Detektion wurde durch Verwendung immer geringerer Konzentrationen der zu analysierenden DNA, der korrespondierenden S-Linker-PNA und der PNA-LCu getestet (**Abb. 14**).



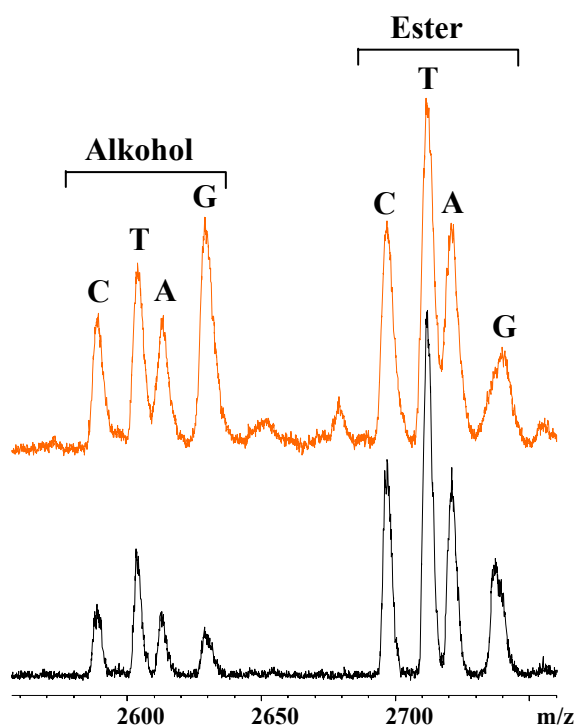
**Abb. 11:** Relative Mengen (in %) der verschiedenen S-Linker-PNAs **11a-C**, **T**, **A**, **G** in ihrer Mischung in Anwesenheit des DNA-Templates **18**. Anfangs besteht eine äquimolare Mischung der S-Linker-PNAs (5  $\mu\text{M}$ ), was 25 % jeder PNA zum Zeitpunkt Null entspricht. Die Mischung enthält außerdem den Katalysator  $\text{Cu}^{2+}$ -PNA **16a** (1  $\mu\text{M}$ ), die Templat-DNA **18** (1  $\mu\text{M}$ ), MOPS 10 mM pH 7 und NaCl 50 mM. Ausgefüllte Rauten: **11a-C**, offene Quadrate: **11a-T**, ausgefüllte Dreiecke: **11a-A**, ausgefüllte Quadrate: **11a-G**. PNA- und DNA-Sequenzen und Nummerierungen sind den **Schemata 3-5** zu entnehmen.

Selbst bei einer Konzentration von nur 10 fmol der zu analysierenden DNA ist der Peak mit der höchsten Intensität in dem Bereich des Spektrums, in dem die Produkte erscheinen, dem Hydrolyseprodukt der S-Linker-PNA zuzuordnen, die komplementär zu der zu analysierenden DNA ist.

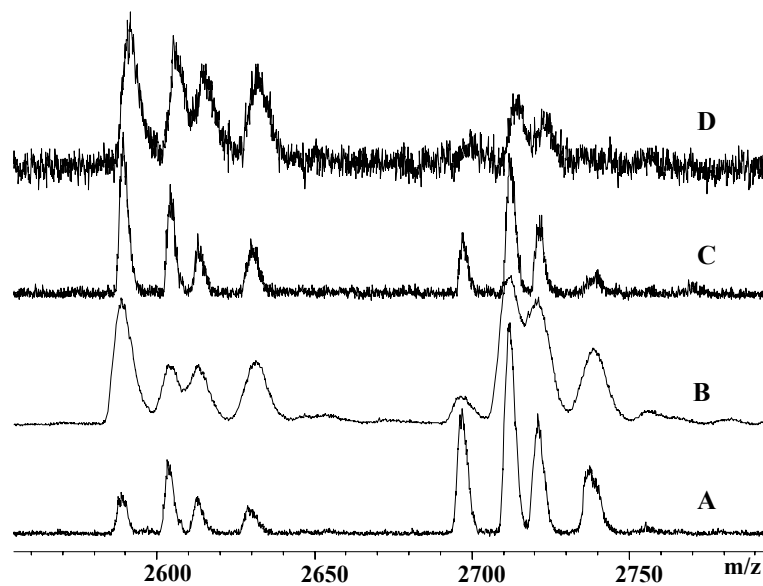
In literarurbekanntenen Methoden zur indirekten DNA-Sequenz-Analyse, die auf der Detektion von PNA-Proben durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie beruhen, wird die Empfindlichkeit hauptsächlich durch die intrinsische Empfindlichkeit des Gerätes und durch die Wiedergewinnung der zu analysierenden Substanz nach den Vorreinigungsstufen bestimmt. Für diese Experimente wurden sowohl die PNA / DNA-Bindung als auch stöchiometrische Reaktionen von PNA-Proben verwendet. Die Empfindlichkeit der DNA-Detektion bei diesen Methoden überschreitet eine DNA-Konzentration von 0,5 pmol nicht, was weniger ist als die Empfindlichkeit des MALDI-TOF-Massenspektrometers bei optimalen Bedingungen<sup>[9]</sup>.



**Abb. 12:** Relative Mengen (in %) der verschiedenen S-Linker-PNAs **11a-C**, **T**, **A**, **G** in ihrer Mischung in Abwesenheit eines Templates. Anfangs besteht eine äquimolare Mischung der S-Linker-PNAs (5  $\mu\text{M}$ ), was 25 % jeder PNA zum Zeitpunkt Null entspricht. Die Mischung enthält außerdem den Katalysator  $\text{Cu}^{2+}$ -PNA **16a** (1  $\mu\text{M}$ ), MOPS 10 mM pH 7 und NaCl 50 mM. Ausgefüllte Rauten: **11a-C**, offene Quadrate: **11a-T**, ausgefüllte Dreiecke: **11a-A**, ausgefüllte Quadrate: **11a-G**. PNA- und DNA-Sequenzen und Nummerierungen sind den **Schemata 3-5** zu entnehmen.



**Abb. 13:** MALDI-TOF-Massenspektrum einer Mischung der S-Linker-PNAs **11a-C**, **T**, **A**, **G** (jeweils 5  $\mu\text{M}$ ), dem Katalysator  $\text{Cu}^{2+}$ -PNA **16a** (1  $\mu\text{M}$ ) mit (orangenes Spektrum) und ohne (schwarzes Spektrum) die Templat-DNA **20** (1  $\mu\text{M}$ ), aufgenommen 60 min nach Zusammengeben der Komponenten. 10 mM MOPS pH 7, NaCl 50 mM.



**Abb. 14:** MALDI-TOF-Massenspektren von Mischungen der S-Linker-PNAs **11a-C**, **T**, **A**, **G** (jeweils 5 eq), der  $\text{Cu}^{2+}$ -PNA **16a** (1 eq) und verschiedenen Mengen der DNA **17** (**A**: keine DNA, **B**: 1 pmol, **C**: 100 fmol, **D**: 10 fmol), aufgenommen 0, 1, 5 bzw. 9 h nach Zusammengeben der Komponenten. 10 mM MOPS pH 7, NaCl 50 mM. PNA- und DNA-Sequenzen und Nummerierungen sind den **Schemata 3-5** zu entnehmen.

Das kann vermutlich durch Verluste des zu analysierenden Stoffes bei dessen Aufreinigung vor der Analyse erklärt werden. Die hier berichtete Methode verbindet die hohe Empfindlichkeit des MALDI-TOF-Massenspektrometers bei der PNA-Detektion mit Signal-Amplifizierung durch katalytischen „turnover“. Die PNA kann ohne Vorreinigung direkt aus der Reaktions-Mischung analysiert werden, was PNA-Verluste minimiert. Das ist ein bedeutender Vorteil, da PNA dazu neigt, an die Oberfläche von Reaktionsgefäßen, HPLC-Säulen, etc. zu binden. Dies ist die erste Methode zur DNA-Detektion, bei der eine Metall-Komplex-katalysierte Reaktion verwendet wird. Es ist vorstellbar, daß durch Verwendung eines effizienteren Metall-Katalysator---Substrat-Paares die Analysenzeit weiter verringert werden kann und eventuell auch der Katalyse-„turnover“ erhöht werden kann.

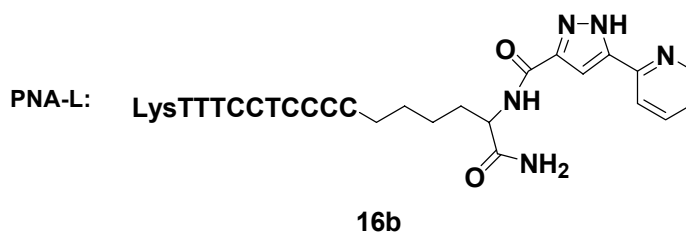
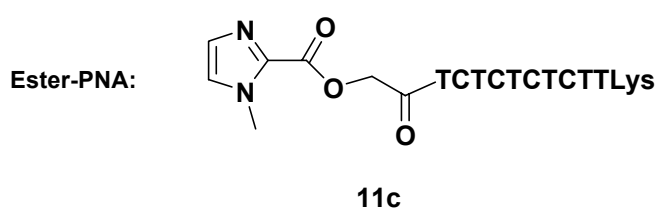
Die Templat-gesteuerte Hydrolyse eines Esters in einer Substrat-PNA, die durch eine  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplex-PNA katalysiert wird, wurde optimiert. Diese Reaktion erreicht eine > 100-fache kinetische Diskriminierung zwischen DNAs, die sich nur an einer einzigen Nukleotid-Position unterscheiden. Das natürliche Enzym T4 DNA-Ligase ist etwas weniger selektiv. Auf Basis dieser Reaktion wurde eine vollständig homogene, empfindliche Methode zur

sequenzspezifischen DNA-Detektion entwickelt (10 fmol DNA). Die Erkennung einer von vier DNAs, die sich nur in einer einzelnen Position unterscheiden, ist in einem einzelnen Experiment möglich. Da das  $\text{Cu}^{2+}$ -Ion fest an ein Assoziat gebunden ist, das aus der Substrat-PNA, der Katalysator-PNA und dem DNA-Templat besteht, kann diese Analysenmethode auch bei Systemen mit Puffern, die  $\text{Cu}^{2+}$ -bindende Liganden enthalten, angewendet werden, wie z. B. PCR-Puffer und physiologischer Puffer.

### 3.3. Metall-Komplex-Katalyse am Doppelstrang-DNA-Templat

#### 3.3.1. Hybridisierungsexperimente

Das ausgewählte Doppelstrang-DNA-Templat (30-mer DNA **34** : DNA **37**, **Schema 6**) besitzt einen deutlich höheren Schmelzpunkt ( $65,0\text{ °C} \pm 0,2\text{ °C}$ ) als die PNA-L : DNA **32** - Duplex und die Ester-PNA : DNA **34** - Duplex ( $50,8\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ ).



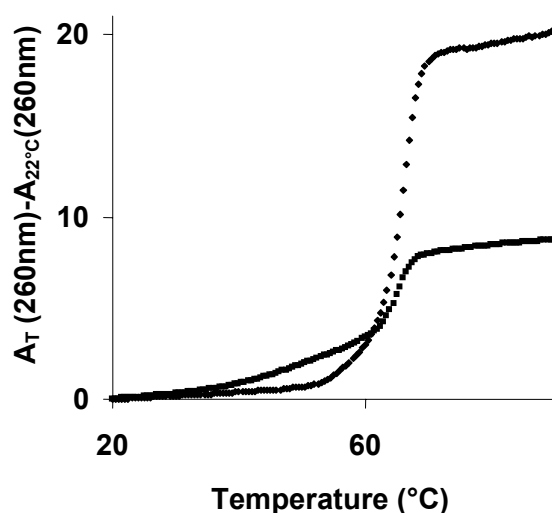
**DNA 34: CGA CGA AGA GAG AGA GGG GAG GAA AGT AGG**  
**DNA 35: CGA CGA AGA GAT AGA GGG GAG GAA AGT AGG**  
**DNA 36: CGA CGA AGA GAG AGA GGG TAG GAA AGT AGG**  
**DNA 37: CCT ACT TTC CTC CCC TCT CTC TCT TCG TCG**  
**DNA 38: CCT ACT TTC CTA CCC TCT CTC TCT TCG TCG**  
**DNA 39: CCT ACT TTC CTC CCC TCT ATC TCT TCG TCG**

**Schema 6:** Sequenzen der Ester-PNA, der PNA-L und der DNAs, die für die Reaktionen am dsDNA-Templat verwendet wurden.

(Die PNA-Sequenzen wurden vom N- zum C-Terminus geschrieben, die DNA-Sequenzen vom 5'-Terminus zum 3'-Terminus.)

Daher kann man erwarten, daß die PNAs nicht mit der DNA **37** um die komplementäre DNA konkurrieren und durch PNA-Addition an den DNA-Doppelstrang nur das Assoziat PNA : dsDNA gebildet wird. Sowohl das Schmelzprofil einer äquimolaren Mischung der

Ester-PNA **11c**, der DNA **34** und der DNA **37** als auch die Schmelzprofile von Mischungen, die bis zu 10 eq Überschuß an Ester-PNA enthalten, weisen einen Übergang bei 65 °C, der mit der DNA-Duplex korrespondiert, und einen zweiten Übergang bei niedrigerer Temperatur ( $55,3 \text{ °C} \pm 0,4 \text{ °C}$ ) auf, der dem Schmelzpunkt des PNA : dsDNA - Assoziates zuzuschreiben ist (Abb. 15).



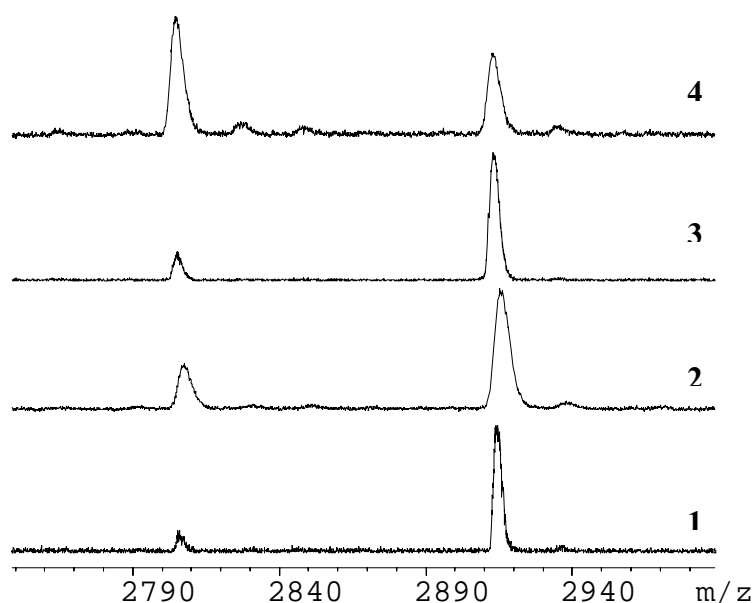
**Abb. 15:** Schmelzprofile der DNA **34** : DNA **37** - Duplex ( $2 \mu\text{M}$ ) in Abwesenheit (ausgefüllte Rauten) und Anwesenheit (ausgefüllte Quadrate) der Ester-PNA **11c** ( $2 \mu\text{M}$ ).  $A_T$ : Absorption bei der Temperatur T. PNA- und DNA-Sequenzen und Nummerierungen sind **Schema 6** zu entnehmen.

In den Untersuchungen der Ester-Hydrolyse am Einzelstrang-DNA-Templat wurde festgestellt, daß  $35 \text{ °C}$  die optimale Temperatur für diese Spaltung ist. Bei dieser Temperatur sollten die PNAs vollständig an das dsDNA-Templat gebunden sein. Die PNA kann entweder unter Ausbildung einer Triplex-Struktur entsprechend **Abb. 6** an die dsDNA binden oder kann sich in die Duplex einlagern, wobei ein 2 : 1 PNA : dsDNA - Assoziat entsteht. In beiden Fällen werden die funktionellen Einheiten an den PNA-Termini (Ester und  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplex) in räumliche Nähe zueinander gebracht. Die Stöchiometrie des Assoziates aus DNA und PNA war in unserem Fall schwer zu bestimmen, da die Triplex-Schmelzübergänge eher breit sind und mit den Duplex-Schmelzübergängen überlagern.

### 3.3.2. Untersuchung der Esterspaltung am Doppelstrang-DNA-Templat mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Wie schon für die Analyse der Esterspaltung am ssDNA-Templat, wurde auch für die Untersuchung der Hydrolyse am dsDNA-Templat MALDI-TOF-Massenspektrometrie als Analysenmethode gewählt, da diese hoch empfindlich ist und dabei auch eine gute Auflösung bietet. Sowohl die Peaks der Edukte als auch die der Produkte konnten mit dieser Methode verfolgt werden.

Die Ester-PNA, die für die Spaltreaktion als Edukt diente, war bereits vor Zugabe des  $\text{Cu}^{2+}$ -PNA-L-Komplexes teilweise hydrolysiert. Daher war bei allen Experimenten schon direkt nach Reaktionsstart ein deutliches Produktsignal zu erkennen (**Abb. 16**, nur  $\sim 80\%$  Reinheit, vgl. auch **Abb. 20**, Elutionsprofil 1).

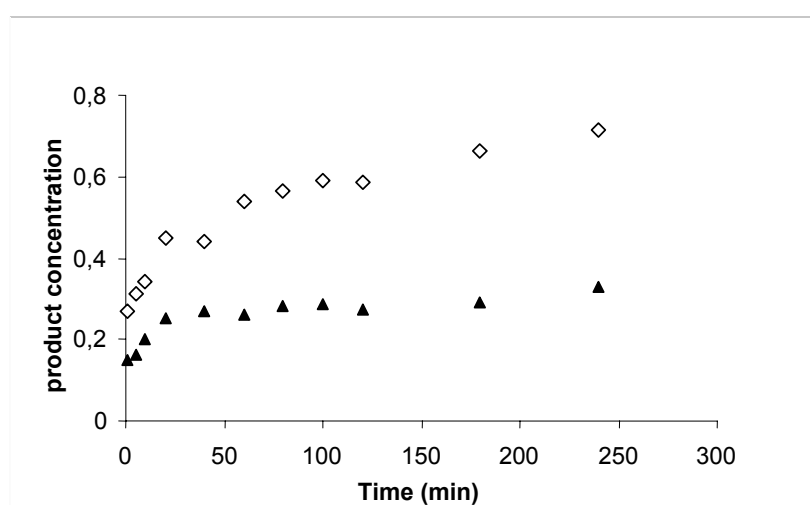


**Abb. 16:** Analyse der Hydrolyse der Ester-PNA **11c** am dsDNA-Templat mittels MALDI-TOF. MALDI-TOF-Massenspektrum 1: Ester-PNA **11c** ( $1\ \mu\text{M}$ ), PNA-L **16b** ( $1\ \mu\text{M}$ ),  $\text{CuSO}_4$  ( $1\ \mu\text{M}$ ), aufgenommen direkt nach dem Zusammengeben der Komponenten; MALDI-TOF-Massenspektrum 2: Ester-PNA **11c** ( $1\ \mu\text{M}$ ), PNA-L **16b** ( $1\ \mu\text{M}$ ),  $\text{CuSO}_4$  ( $1\ \mu\text{M}$ ), aufgenommen 100 min nach dem Zusammengeben der Komponenten; MALDI-TOF-Massenspektrum 3: Ester-PNA **11c** ( $1\ \mu\text{M}$ ), PNA-L **16b** ( $1\ \mu\text{M}$ ),  $\text{CuSO}_4$  ( $1\ \mu\text{M}$ ), DNA **34** : DNA **37** ( $1\ \mu\text{M}$ ) aufgenommen direkt nach dem Zusammengeben der Komponenten; MALDI-TOF-Massenspektrum 4: Ester-PNA **11c** ( $1\ \mu\text{M}$ ), PNA-L **16b** ( $1\ \mu\text{M}$ ),  $\text{CuSO}_4$  ( $1\ \mu\text{M}$ ), DNA **34** : DNA **37** ( $1\ \mu\text{M}$ ) aufgenommen 100 min nach dem Zusammengeben der Komponenten. Puffer: MOPS 10 mM, pH 7, NaCl 50 mM. PNA- und DNA-Sequenzen und Nummerierungen sind **Schema 6** zu entnehmen.



Die Ester-PNA wird auch durch den PNA-LCu-Komplex leicht aktiviert (18 % Spaltung der Ester-PNA nach 100 min, **Tab. 2**). Dennoch ist ein deutlicher Unterschied zwischen den Ester-Spaltgeschwindigkeiten in Anwesenheit und Abwesenheit des Templats festzustellen. **Abb. 16** zeigt die MALDI-TOF-Massenspektren der Ester-PNA **11c**-Spaltung durch den  $\text{Cu}^{2+}$ -PNA-L **16b**-Komplex in Anwesenheit und Abwesenheit des DNA **34** : DNA **37**-Duplex-Templates, jeweils direkt nach Zusammengeben aller Komponenten und 100 min nach Reaktionsstart.

In **Abb. 17** ist der zeitliche Verlauf der Hydrolyse der Ester-PNA **11c** in Anwesenheit und Abwesenheit der DNA **34** : DNA **37**-Duplex dargestellt.



**Abb. 17:** Hydrolyse der Ester-PNA **11c** ( $1 \mu\text{M}$ ) durch die  $\text{Cu}^{2+}$ -PNA-L **14b** ( $1 \mu\text{M}$ ) in Anwesenheit (offene Rauten) und Abwesenheit (ausgefüllte Dreiecke) der DNA **34** : DNA **37**-Duplex ( $1 \mu\text{M}$ ). 10 mM MOPS pH 7, NaCl 50 mM. PNA- und DNA-Sequenzen und Nummerierungen sind **Schema 6** zu entnehmen.

In Anwesenheit des DNA **34** : DNA **37**-Templats, das zu der Ester-PNA und der PNA-LCu komplementär ist, ist die Spaltung der Ester-PNA am effizientesten (55 % Spaltung nach 100 min). In Anwesenheit des dsDNA-Templats ist die anfängliche Spaltung der Ester-PNA 7-mal schneller als in Abwesenheit eines Templats.

Doppelstrang-Templates, die entweder auf der Seite, an der die Ester-PNA bindet, oder auf der Seite, an der die PNA-LCu bindet, „mismatches“ besitzen, beschleunigen die Ester-Hydrolyse nicht wesentlich im Vergleich zur Hintergrund-Hydrolyse (**Tab. 2**, entries 2, 3). Ein Einzelstrang als Templat ist etwas weniger effizient als der Doppelstrang (entry 4). Diese

Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen der zuvor untersuchten Reaktionen am Einzelstrang-DNA-Templat überein.

**Tab. 2:** Ausbeuten und relative Geschwindigkeiten der Ester-PNA **11c**-Spaltung am ds-DNA-Templat. PNA- und DNA-Sequenzen und Nummerierungen sind **Schema 6** zu entnehmen.

Entry	Templat/ Konzentration ( $\mu\text{M}$ )	$v_{\text{Templat}}/v_{\text{Hintergrund}}^b$	Puffer <sup>c</sup>	Ester-Spaltung (%) <sup>d</sup>
1	DNA <b>34</b> : DNA <b>37</b> / 1	$7.1 \pm 1.4$	A	55
2	DNA <b>35</b> : DNA <b>39</b> / 1	$1.4 \pm 0.3$	A	26
3	DNA <b>36</b> : DNA <b>38</b> / 1	$1.5 \pm 0.3$	A	27
4	DNA <b>34</b> / 1	$5.1 \pm 1.0$	A	47
5	DNA <b>34</b> : DNA <b>37</b> / 0.2	$4.0 \pm 2.1$	A	155
6	kein Templat	1	A	18
7	DNA <b>34</b> : DNA <b>37</b> / 1	$8.0 \pm 1.5$	B	63
8	DNA <b>34</b> / 1	$7.9 \pm 1.4$	B	56
9	kein Templat	1	B	23

<sup>a</sup> [Ester-PNA] = 1  $\mu\text{M}$ , [PNA-L] = [CuSO<sub>4</sub>] = [Templat].

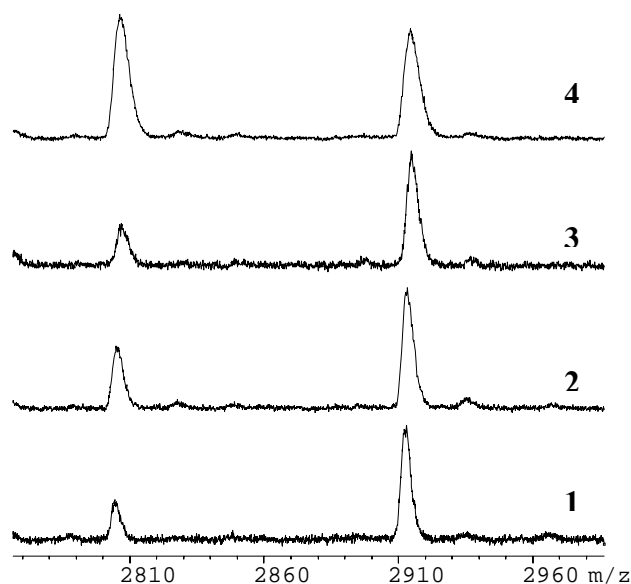
<sup>b</sup> Verhältnis der anfänglichen Geschwindigkeiten der Ester-PNA-Spaltung in Anwesenheit und Abwesenheit des Templats; die Hintergrund-Spaltgeschwindigkeit wurde für die entries 1-5 in Puffer A und für die entries 7-8 in Puffer B bestimmt.

<sup>c</sup> Puffer A: MOPS 10 mM pH 7, NaCl 50 mM; Puffer B: Phosphat 10 mM pH 7, NaCl 150 mM.

<sup>d</sup> Ausbeute der Ester-PNA-Spaltreaktion (relativ zur in der Mischung anwesenden Templat-DNA), bestimmt 180 min nach Reaktionsbeginn.

Selbst in Anwesenheit katalytischer Mengen der DNA **34** : DNA **37** - Duplex (0,2 eq) ist die Hydrolyse der Ester-PNA noch 4-mal schneller als die Hintergrund-Hydrolyse. Unter diesen Bedingungen sind nach 100 min 155 % (bezogen auf die dsDNA) der Ester-PNA hydrolysiert. In **Abb. 18** sind die MALDI-TOF-Massenspektren der Ester-PNA **11c** - Hydrolyse in Anwesenheit und Abwesenheit katalytischer Mengen (0,2 eq) der DNA **34** : DNA **37** -Duplex direkt nach Zusammengeben aller Komponenten und nach 100 min abgebildet. Die Hydrolyse-Reaktion am dsDNA-Templat läuft – wie auch schon die Hydrolyse am ssDNA-Templat – auch in physiologischem Puffer ab (**Tab. 2**, entries 7-9). Daher können auch hier Proben verwendet werden, die z. B. Phosphat- oder Chlorid-Anionen enthalten, die die

katalytische Aktivität von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen inhibieren können, wenn sie in hohen Konzentrationen vorliegen. Dadurch würde die Detektion von nicht vorgereinigten Nukleinsäuren (z. B. aus PCR oder aus biologischen Proben) deutlich limitiert werden.

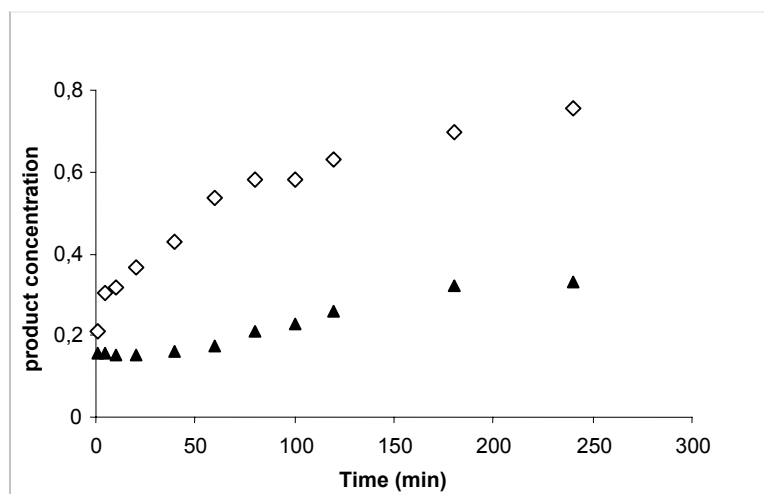


**Abb. 18:** Analyse der Hydrolyse der Ester-PNA **11c** in Anwesenheit und Abwesenheit katalytischer Mengen des dsDNA-Templates (0,2 eq) mittels MALDI-TOF.

MALDI-TOF-Massenspektrum 1: Ester-PNA **11c** (5  $\mu\text{M}$ ), PNA-L **16b** (1  $\mu\text{M}$ ),  $\text{CuSO}_4$  (1  $\mu\text{M}$ ), aufgenommen direkt nach dem Zusammengeben der Komponenten; MALDI-TOF-Massenspektrum 2: Ester-PNA **11c** (5  $\mu\text{M}$ ), PNA-L **16b** (1  $\mu\text{M}$ ),  $\text{CuSO}_4$  (1  $\mu\text{M}$ ), aufgenommen 100 min nach dem Zusammengeben der Komponenten; MALDI-TOF-Massenspektrum 3: Ester-PNA **11c** (5  $\mu\text{M}$ ), PNA-L **16b** (1  $\mu\text{M}$ ),  $\text{CuSO}_4$  (1  $\mu\text{M}$ ), DNA **34** : DNA **37** (1  $\mu\text{M}$ ) aufgenommen direkt nach dem Zusammengeben der Komponenten; MALDI-TOF-Massenspektrum 4: Ester-PNA **11c** (5  $\mu\text{M}$ ), PNA-L **16b** (1  $\mu\text{M}$ ),  $\text{CuSO}_4$  (1  $\mu\text{M}$ ), DNA **34** : DNA **37** (1  $\mu\text{M}$ ) aufgenommen 100 min nach dem Zusammengeben der Komponenten. Puffer: MOPS 10 mM, pH 7, NaCl 50 mM. PNA- und DNA-Sequenzen und Nummerierungen sind **Schema 6** zu entnehmen.

**Abb. 19** zeigt den zeitlichen Verlauf der Ester-PNA **11c** - Spaltung in Phosphat-Puffer in Anwesenheit und Abwesenheit der DNA **34** : DNA **37** - Duplex. Die Geschwindigkeit der dsDNA-Templat-gesteuerten Reaktion ist praktisch unabhängig vom verwendeten Puffer. Das kann mit einer außergewöhnlich hohen Stabilität des Komplexes  $\text{S} : \text{CuL}$  erklärt werden, die

vermutlich ein Resultat der Präorganisation der korrespondierenden Liganden am dsDNA-Templat ist (**Abb. 6**).

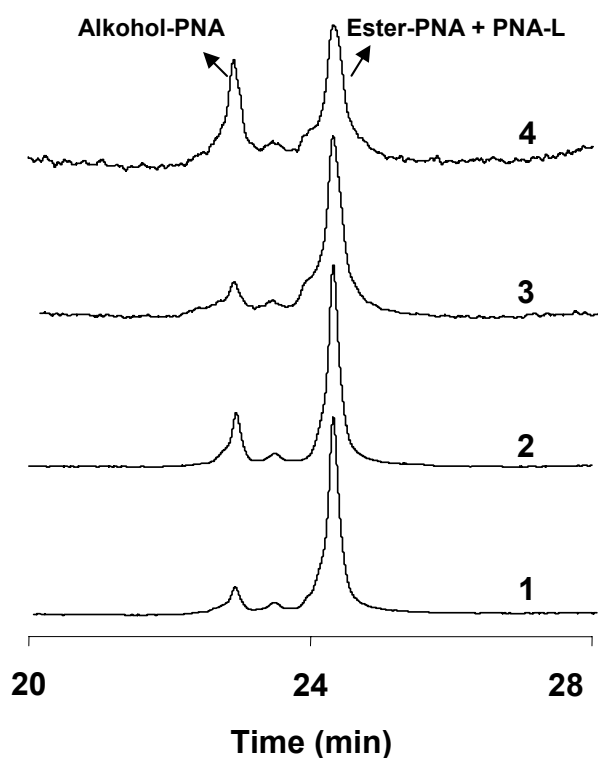


**Abb. 19:** Hydrolyse der Ester-PNA **11c** (1  $\mu\text{M}$ ) durch die  $\text{Cu}^{2+}$ -PNA-L **14b** (1  $\mu\text{M}$ ) in Phosphat-Puffer (Phosphat: 10 mM pH 7, NaCl 150 mM) in Anwesenheit (offene Rauten) und Abwesenheit (ausgefüllte Dreiecke) der DNA **34** : DNA **37** - Duplex (1  $\mu\text{M}$ ). PNA- und DNA-Sequenzen und Nummerierungen sind **Schema 6** zu entnehmen.

#### 4.3.3. Untersuchung der Esterspaltung am Doppelstrang-DNA-Templat mittels HPLC

Die Esterspaltung am dsDNA-Templat wurde auch mit Hilfe von HPLC untersucht. In **Abb. 20** sind die HPLC-Elutionsprofile der Ester-Spaltung in Anwesenheit und Abwesenheit des Doppelstrang-DNA-Templates dargestellt. Proben der Reaktionsmischungen wurden jeweils direkt nach Zusammengeben der Komponenten und nach 100 min injiziert. Die Peaks der Ester-PNA **11c** und des PNA-L-Konjugats **16b** überlappen bei unseren experimentellen Bedingungen völlig miteinander, weshalb für diese beiden Komponenten nur ein Peak im Elutionsprofil sichtbar wird. Die Produkt-PNA (Alkohol-PNA) wird hingegen früher eluiert und ist als einzelner Peak erkennbar.

Die HPLC-Analyse bestätigt die bereits mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie erhaltenen Ergebnisse.



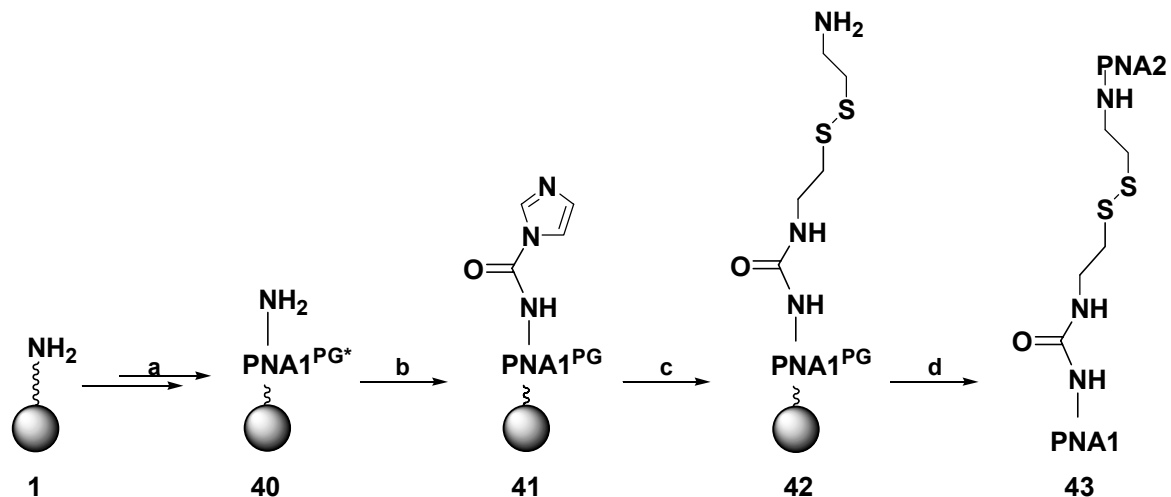
**Abb. 20:** HPLC-Analyse der Hydrolyse der Ester-PNA **11c** am dsDNA-Templat.

Die Peaks der Ester-PNA- **11c** und der PNA-L-Konjugate **16b** überlappen bei unseren experimentellen Bedingungen vollständig miteinander ( $R_t = 24,3$  min). HPLC-Elutionsprofil 1: Ester-PNA ( $1 \mu\text{M}$ ), PNA-L ( $1 \mu\text{M}$ ),  $\text{CuSO}_4$  ( $1 \mu\text{M}$ ), aufgenommen direkt nach dem Zusammengeben der Komponenten; HPLC-Elutionsprofil 2: Ester-PNA ( $1 \mu\text{M}$ ), PNA-L ( $1 \mu\text{M}$ ),  $\text{CuSO}_4$  ( $1 \mu\text{M}$ ), aufgenommen 100 min nach dem Zusammengeben der Komponenten; HPLC-Elutionsprofil 3: Ester-PNA ( $1 \mu\text{M}$ ), PNA-L ( $1 \mu\text{M}$ ),  $\text{CuSO}_4$  ( $1 \mu\text{M}$ ), DNA **34** : DNA **37** ( $1 \mu\text{M}$ ) aufgenommen direkt nach dem Zusammengeben der Komponenten; HPLC-Elutionsprofil 4: Ester-PNA ( $1 \mu\text{M}$ ), PNA-L ( $1 \mu\text{M}$ ),  $\text{CuSO}_4$  ( $1 \mu\text{M}$ ), DNA **34** : DNA **37** ( $1 \mu\text{M}$ ) aufgenommen 100 min nach dem Zusammengeben der Komponenten. Puffer: MOPS 10 mM pH 7, NaCl 50 mM. PNA- und DNA-Sequenzen und Nummerierungen sind **Schema 6** zu entnehmen.

### 3.4. Hybridisierungsabhängige Spaltung von intern Disulfid-modifizierten Peptidnukleinsäuren

#### 3.4.1. Synthesen

Die Disulfid-modifizierten PNAs **43a-c** wurden entsprechend **Schema 7** synthetisiert.



43a: PNA1 - AACTA-Lys, PNA2 - Lys-CATGG  
 43b: PNA1 - TCACA ACTA-Lys, PNA2 - Lys-GGATGGA  
 43c: PNA1 - TTGGCACT-Lys, PNA2 - Lys-CATATTGC

DNA 44: TAG TTC CAT G  
 DNA 44a: TAT TTC CAT G  
 DNA 44b: TAG TTC CCT G  
 DNA 44c: TAT TTC CCT G  
 DNA 44d: TAG TTI CCA TG  
 DNA 44e: TAG TTI ICC ATG  
 DNA 45: TAG TTG TGA TCC ATC C  
 DNA 45a: TAG TTG TGA TCC CTC C  
 DNA 45b: TAG TGG TGA TCC ATC C  
 DNA 46: AGT GCC AAG CAA TAT G  
 DNA 46a: AGT GAC AAG CAA TAT G  
 DNA 46b: AGT GCC AAG CAC TAT G

**Schema 7:** Synthesen der intern modifizierten PNAs.

a) PNA-Synthese; b) CDI, DMSO; c) (H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S)<sub>2</sub>, DIEA, DMSO; d) 1. PNA-Synthese, 2. TFA, m-Cresol; (\*) PG – protecting groups: Bhoc für Nukleobasen und Boc für Lysin-Seitenketten NH<sub>2</sub>; „mismatch“-Basen sind unterstrichen und kursiv dargestellt, „bulges“ unterstrichen.

Zunächst wurde über Festphasensynthese PNA1 dargestellt. Nach Aktivierung der freien Amino-Gruppe von PNA1 durch CDI wurde unter Verwendung von Cystamin-Dihydrochlorid eine Disulfid-Gruppe angekoppelt. Abschließend wurde an die resultierende freie Aminogruppe PNA2 synthetisiert. Das erhaltene Produkt wurde mit TFA / m-Cresol von der Festphase abgespalten und entschützt und dann mittels HPLC gereinigt.

### 3.4.2. Hybridisierungsexperimente

Durch die interne Modifikation in den PNAs **43a-c** sind in das PNA-Rückgrat 9 zusätzliche Atome inseriert. Unter der Voraussetzung, daß diese PNAs mit ihren komplementären DNAs typische Duplices bilden, sollte diese Modifikation eine schleifenförmige Struktur annehmen. Um zu testen, ob diese PNAs DNAs sequenzspezifisch binden, wurden mit Hilfe eines UV-Gerätes Schmelzpunktexperimente durchgeführt (**Tab. 3**).

**Tab. 3:** Schmelzpunkte von PNA / DNA-Duplices.  
PNA- und DNA-Sequenzen und Nummerierungen sind **Schema 7** zu entnehmen.

Entry	PNA:DNA <sup>a</sup>	Puffer <sup>b</sup>	T <sub>m</sub> (°C)
1	<b>43a:44</b>	Wasser	39.2 ± 0.2
2	<b>43a:44a</b>	Wasser	28.2 ± 1.2
3	<b>43a:44b</b>	Wasser	23.0 ± 1.0
4	<b>43a:44c</b>	Wasser	20.4 ± 0.8
5	<b>43a:44</b>	20 % CH <sub>3</sub> CN in Wasser	28.9 ± 0.2
6	<b>43a:44b</b>	20 % CH <sub>3</sub> CN in Wasser	20.7 ± 0.3
7	<b>43a:44c</b>	20 % CH <sub>3</sub> CN in Wasser	18.6 ± 0.9
8	<b>43a:44d</b>	Wasser	34.6 ± 0.4
9	<b>43a:44e</b>	Wasser	34.9 ± 1.5
10	<b>43b:45</b>	Wasser	66.3 ± 1.1
11	<b>43b:45</b>	20 % CH <sub>3</sub> CN in Wasser	56.5 ± 1.8
12	<b>43c:46</b>	Wasser	62.1 ± 0.4
13	<b>43c:46</b>	20 % CH <sub>3</sub> CN in Wasser	52.6 ± 0.1

<sup>a</sup> [PNA]=[DNA]= 2µM. <sup>b</sup> MOPS 1 mM pH 7, NaCl 50 mM.

Eine weitere entscheidende Frage war, ob beide an das Disulfid gebundenen PNA-Teile an die komplementäre DNA binden. Tatsächlich ist der Schmelzpunkt der Duplex **43a:44**

deutlich höher als die Schmelzpunkte der Duplices von PNA **43a** mit DNAs, die ein einzelnes „mismatch“ an den gegenüberliegenden Seiten der internen Modifikation enthalten (**44a, b**) oder zwei „mismatches“ (**44c**; **Tab. 3**, entries 2-4). Das weist darauf hin, daß beide an das Disulfid gebundenen PNA-Teile in PNA **43a** an die komplementäre DNA **44** gebunden sind. Verdünnte wäßrige Lösungen von Einzelstrang-Disulfid-PNAs (PNA 1-10  $\mu\text{M}$ , MOPS-Puffer 1 mM pH 7) sind nicht für lange Zeit stabil, da die PNA mit der Zeit an den Wänden der Eppendorf-Kunststoffgefäße absorbiert wird oder ausfällt. Daher wurden für alle kinetischen Experimente wäßrige Lösungen mit 20 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  verwendet. In dieser Lösungsmittelmischung ist die Duplex **43a:44** weniger stabil als in reinem Wasser, was in einer Schmelzpunktniedrigung von  $\Delta T_m = 10,2 \text{ }^\circ\text{C}$  zum Ausdruck kommt. Dennoch ist unter diesen Bedingungen die Bindung von **43a** an DNA genauso sequenzspezifisch (**Tab. 3**, entries 5-7).

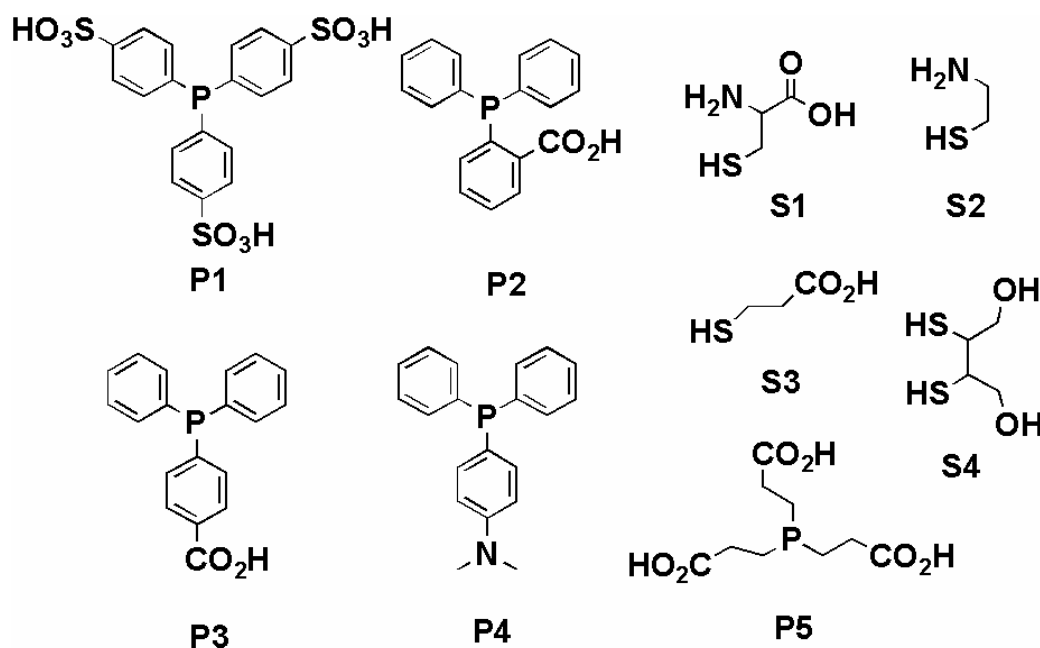
In analogen Duplices der PNAs mit DNAs, die der Disulfid-Modifikation gegenüberliegende zusätzliche „bulge“-Nukleotide enthalten (+6 Atome pro „bulge“ im DNA-Rückgrat), wird die Schleife in der PNA-Struktur mehr gestreckt. Diese Verzerrung kann die Destabilisierung der Duplices **43a:44d** und **43a:44e** im Vergleich zur Duplex **43a:44** (**Tab. 3**, entries 8 und 9) zumindest teilweise erklären. In allen weiteren Experimenten wurden daher die stabileren Duplices von PNAs mit DNAs, die keine zusätzlichen Nukleotide (keine „bulges“) enthalten, verwendet.

### 3.4.3. Optimierung der Disulfid-PNA-Spaltung

Um Bedingungen zu finden, unter denen die PNA-Spaltungs-Reaktion möglichst stark durch komplementäre DNA beeinflusst wird, wurde eine Reihe von Spaltreagenzien getestet. Es wurden Phosphine (**P1-P5**) und Thiole (**S1-S4**; **Schema 8**) ausgewählt, die unterschiedliche Ladungen und Größen besitzen (**Tab. 4**).

Repräsentative HPLCs von Mischungen von **P1** und **43a** mit und ohne DNA sind in **Abb. 19** gezeigt. Wie erwartet werden durch die Spaltung von **43a** zwei kürzere PNA-Fragmente gebildet. Die Beschriftung der Peaks bei der HPLC basiert auf Untersuchungen mit MALDI-TOF Massenspektrometrie. In Anwesenheit von komplementärer DNA **44** und DNA **44b**, die ein einzelnes „mismatch“ enthält, wurden die Elutionsprofile der Spaltprodukte 5 h nach Zugabe von **P1** zu **43a:44** aufgenommen (**Abb. 21**; Elutionsprofil 1).





**Schema 8:** Getestete Spaltreagenzien der Disulfid-modifizierten PNAs.

Hingegen ist die Spaltung von PNA **43c** in Anwesenheit von DNA **44c**, die zwei „mismatch“-Nukleobasen enthält, und in Abwesenheit jeglicher DNA deutlich schneller (**Abb. 21**, Elutionsprofil 3 bzw. 4). Der inhibierende Effekt der DNA hängt stark von deren Konzentration ab. So wird z. B. die Spaltung von **43a** durch **P1** in Anwesenheit von 3 Äquivalenten komplementärer DNA praktisch vollständig unterdrückt. Bei  $[43a] / [44] = 1$  ist schon eine deutliche Spaltung von **43a** festzustellen, was mit einer unvollständigen Ausbildung der PNA / DNA-Duplex zu erklären ist ( $T_m = 29,0 \text{ °C} \pm 1,1 \text{ °C}$  für **43a:44**). Deshalb wurden für alle weiteren Experimente mit PNA **43a** 3 Äquivalente DNA verwendet, um die Duplex-Dissoziation zu unterdrücken.

Die anderen synthetisierten Disulfid-PNAs (**43b**, **c**) werden durch ihre komplementären DNAs vollständig gebunden (**Tab. 3**, entries 10-13). Schon bei äquimolaren DNA-Konzentrationen wurden bei diesen PNAs starke Inhibierungseffekte durch die DNA auf die reduktive Spaltung beobachtet (**Tab. 4**). Das Verhältnis der Spaltprodukte der Disulfid-PNA zu einem bestimmten Zeitpunkt in Anwesenheit und Abwesenheit von DNA wurde als Selektivitätsfaktor **SF** definiert. Er beschreibt grob den Reaktivitätsunterschied von PNA in gebundener und ungebundener Form; denn da das Reduktionsmittel in deutlichem Überschuss verwendet wird, läuft die Spaltreaktion zu Anfang (bis ca. 50 % Umsatz) mit konstanter Geschwindigkeit ab (**Tab. 4**). Alle Thiole, mit Ausnahme von Dithiothreitol (**S4**, **SF** = 10,2),

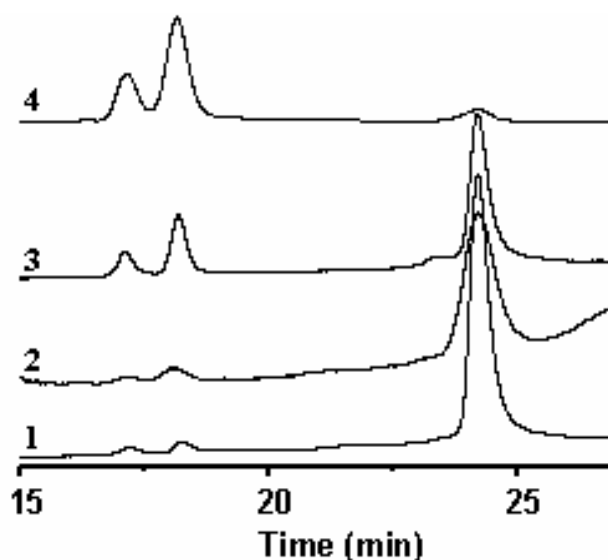
spalten PNA **43a** praktisch unabhängig von der Anwesenheit komplementärer DNA (**SF** = 0,6-1,5) und sind bei der Disulfid-Reduktion weniger selektiv als Phosphine.

**Tab. 4:** Spaltung der Disulfid-PNA durch verschiedene Phosphine und Thiole.  
PNA- und DNA-Sequenzen und Nummerierungen sind **Schema 7** zu entnehmen.

PNA: DNA	Zeit min.	Spaltreagenz Eq <sup>a</sup>	PNA-Spaltung %		SF <sup>b</sup>
			- DNA	+ DNA	
<b>43a:44</b>	300	<b>P1</b> , 10 <sup>2</sup>	88.1	3.7	23.8
<b>43a:44</b> <sup>c</sup>	300	<b>P1</b> , 10 <sup>2</sup>	97.6	21.0	4.6
<b>43a:44</b>	30	<b>P2</b> , 10 <sup>2</sup>	69.1	43.7	1.6
<b>43a:44</b>	30	<b>P3</b> , 10 <sup>2</sup>	92.9	88.6	1.0
<b>43a:44</b>	0.5	<b>P4</b> , 10 <sup>2</sup>	19.5	23.0	0.9
<b>43a:44</b>	2	<b>P5</b> , 10 <sup>2</sup>	100	70.7	> 1 <sup>d</sup>
<b>43a:44b</b>	2	<b>P5</b> , 10 <sup>2</sup>	100	98.6	≥ 1 <sup>d</sup>
<b>43a:44</b>	10	<b>S1</b> , 10 <sup>3</sup>	16.2	28.4	0.6
<b>43a:44</b>	2	<b>S2</b> , 10 <sup>3</sup>	86.8	56.1	1.5
<b>43a:44</b>	30	<b>S3</b> , 10 <sup>3</sup>	52.3	78.9	0.7
<b>43a:44</b>	30	<b>S4</b> , 10 <sup>3</sup>	77.2	7.6	10.2
<b>43b:45</b>	20	<b>P5</b> , 10 <sup>2</sup>	31.2	1.8	17.3
<b>43b:45a</b>	20	<b>P5</b> , 10 <sup>2</sup>	31.2	4.2	7.4
<b>43b:45b</b>	20	<b>P5</b> , 10 <sup>2</sup>	31.2	10.8	2.9
<b>43b:45</b>	300	<b>P1</b> , 10 <sup>2</sup>	91.1	9.0	10.1
<b>43c:46</b>	20	<b>P5</b> , 10 <sup>2</sup>	97.6	1.7	57.1
<b>43c:46a</b>	20	<b>P5</b> , 10 <sup>2</sup>	97.6	3.8	25.7
<b>43c:46b</b>	20	<b>P5</b> , 10 <sup>2</sup>	97.6	4.4	22.2
<b>43c:46a</b>	300	<b>P1</b> , 10 <sup>2</sup>	95.2	34.6	2.8

<sup>a</sup> für die Strukturformeln von **P1-P5**, **S1-S4** siehe **Schema 8** <sup>b</sup> SF ist ein Selektivitätsfaktor: Verhältnis der Menge gespaltener PNA in Abwesenheit und Anwesenheit von komplementärer DNA; <sup>c</sup> mit NaCl 0.5 M; <sup>d</sup> der Selektivitätsfaktor kann nicht genau bestimmt werden, da die Reaktion in Abwesenheit von DNA vollständig abgelaufen ist; [PNA]= 2µM, [DNA]= 6 µM (für PNA **43a**) und 2 µM (für die anderen PNAs), MOPS 1 mM, pH 7, 20 % CH<sub>3</sub>CN in Wasser.

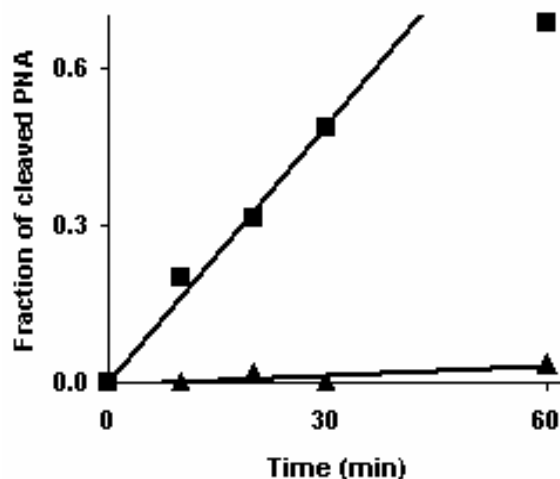
Das negativ geladene, sperrige Phosphin **P1** zeigt eine hohe Selektivität bei der Spaltung von PNA **43a** (**SF** = 23,8). Das poly-geladene Phosphin **P5** hingegen spaltet die PNA so schnell, daß bei den Konzentrationen, die für die anderen Phosphine verwendet wurden, kein Selektivitätsfaktor SF bestimmt werden konnte (**Tab. 4**). Die anderen untersuchten Phosphine (**P2-P4**) spalten die Disulfid-PNA unselektiv. Die selektive Spaltung der PNA durch **P1** wurde qualitativ mit zwei anderen Disulfid-PNAs (**43b** und **43c**) reproduziert (**Tab. 4**).



**Abb. 21:** HPLC-Elutionsprofile der Mischungen von PNA **43a** ( $2 \mu\text{M}$ ) mit 3 Äquivalenten komplementärer DNA **44** (Elutionsprofil 1), „mismatch“-DNA **44b** (Elutionsprofil 2) bzw. **44c** (Elutionsprofil 3) und ohne DNA (Elutionsprofil 4), aufgenommen 5 h nach Zugabe von **P1** ( $200 \mu\text{M}$ ). Puffer: MOPS 1 mM, pH 7 in  $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O}$  (1 / 4, V / V). PNA **43a** wird nach 24,5 min eluiert, ihre Spaltprodukte nach 18,2 min und 17,1 min. PNA- und DNA-Sequenzen und Nummerierungen sind **Schema 7** zu entnehmen.

Die Inhibierung durch DNA bei der Spaltung von PNA durch **P1** hängt stark von der PNA-Sequenz ab, was sich in einer Schwankung des **SF**-Wertes zwischen 2,8 und 23,8 äußert. Die Spaltung durch **P5** ist schneller und empfindlicher bezüglich des Hybridisierungszustandes der PNA als die durch die anderen Spaltreagenzien (**SF** = 17,3 für **43b** und 57,1 für **43c**). Sie ist außerdem empfindlicher gegenüber „mismatches“, was an einer Verringerung der **SF**-Werte um einen Faktor von 2,2-6,0 für „mismatch“-enthaltende PNA / DNA-Duplicates erkennbar ist (**Tab. 4**). Die genaue Geschwindigkeit der Spaltung von **43b** durch **P5** wurde in Anwesenheit und Abwesenheit von komplementärer DNA **7** untersucht (**Abb. 22**).

Die Geschwindigkeit der Spaltung von PNA **43b** ist über die ersten 30 min praktisch konstant ( $> 50 \%$  Disulfid-Spaltung). Das bestätigt die Gültigkeit des zuvor eingeführten Selektivitätsfaktors (**SF**) für ein schnelles „screening“ der Verhältnisse der Reaktivitäten der Disulfid-PNAs bei der reduktiven Spaltreaktion in Anwesenheit und Abwesenheit komplementärer DNA.



**Abb. 22:** Spaltung der PNA **43b** durch das Phosphin **P5** in Anwesenheit (▲) und Abwesenheit (■) von komplementärer DNA **45**; MOPS 1 mM, pH 7, [PNA] = [DNA] = 8  $\mu$ M, [P5] = 800  $\mu$ M, CH<sub>3</sub>CN / H<sub>2</sub>O (1 / 4, V / V). PNA- und DNA-Sequenzen und Nummerierungen sind **Schema 7** zu entnehmen.

Mehrere Effekte können die hybridisierungsabhängige Spaltung von Disulfid-PNAs beeinflussen. Zum einen kann die spezifische Erkennung des Substrats durch den Reaktand (Phosphin oder Thiol) eine Rolle spielen. So haben z. B. viele Enzyme Substrat-spezifische Bindungs-„pockets“. In unserem chemischen Modell ist die Größe des Reaktanden zu gering, um eine solche Tasche zur Bindung von PNA zu formen. Zum anderen ist das Disulfid in der wohldefinierten, unbeweglichen Struktur der PNA / DNA-Duplex für eine Wechselwirkung mit den Spaltreagentien weniger zugänglich als in der unstrukturierten, flexiblen Einzelstrang-PNA<sup>[30]</sup>. Daher ist zu erwarten, daß sterisch anspruchsvollere Spaltreagentien bevorzugt Einzelstrang-PNA spalten. Dieser Mechanismus stimmt allerdings nicht mit der Tatsache überein, daß für das Triphenylphosphin **P1** und das Trialkylphosphin **P5**, die beide (-3)-geladen sind, die höhere Selektivität bei dem sterisch weniger anspruchsvollen Trialkylphosphin **P5** beobachtet wurde. Des weiteren könnte die elektrostatische Anziehung zwischen Substrat und Spaltreagenz ein bestimmender Faktor sein, der die Selektivität der Spaltung der ssPNA beeinflusst, da ssPNA und PNA / DNA-Duplex unterschiedlich geladen sind. Das stimmt mit der Mehrheit unserer experimentellen Ergebnisse überein. So zeigen die einfach negativ geladenen Spaltreagenzien **P2**, **P3**, **S3**, das zwitterionische **S1** und die positiv geladenen Spaltreagenzien **P4** und **S2** keine oder nur geringe Selektivität. Hingegen spalten

die (-3)-geladenen Phosphine **P1** und **P5**, bei denen eine starke Abstoßung durch die negativ geladene PNA / DNA-Duplex zu erwarten ist, nur ssPNA effizient.

Kürzlich wurde eine Methode zur DNA-Sequenz-Analyse, die auf der selektiven Bindung von kationischen Poly(fluorenphenylen)-Derivaten an PNA / DNA-Duplices beruht, veröffentlicht<sup>[51]</sup>. Der Unterschied der Affinitäten des polymeren Farbstoffes zu positiv geladener ssPNA und negativ geladener PNA / DNA-Duplex wird ebenfalls durch elektrostatische Wechselwirkungen bestimmt.

Dithiothreitol **S4** spaltet ssPNAs schneller als PNA / DNA-Duplices (**SF** = 10,2). Da **S4** neutral ist, unterscheiden sich die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Spaltreagenz und ssPNA bzw. PNA / DNA-Duplex nicht wesentlich. Man kann vermuten, daß die Selektivität in diesem Fall durch sterische Faktoren zu begründen ist. Dabei bleibt allerdings unklar, warum **S4** nicht dem Trend folgt, der für die acht anderen Disulfid-Spaltreagenzien festgestellt wurde. Der DNA-Inhibierungseffekt bei der Spaltung von **43a** durch das Triphenylphosphin **P1** wird um einen Faktor von 5,7 verringert, wenn die Reaktion in Anwesenheit von 0,5 M NaCl durchgeführt wird, wohingegen die Salzkonzentration auf die Spaltung der ssPNA praktisch keinen Einfluß hat (**Tab. 4**, entry 2). Diese Beobachtung spricht ebenfalls für die Wichtigkeit der elektrostatischen Wechselwirkungen bei der untersuchten Spaltreaktion.

Sowohl bei der betrachteten chemischen Reaktion als auch bei der DNA-Spaltung durch unspezifische Nukleasen sind Einzelstrang-Substrate reaktiver als hybridisierte. Bei beiden Methoden – unserer chemischen und der auf Nukleasen basierenden – ist eine Unterscheidung zwischen DNAs, die sich nur in einer einzigen Base unterscheiden, möglich (**Abb. 21**, **Tab. 4**). Tris-(carboxyethyl)-phosphin **P5** zeigte bei der Spaltung der ss-Disulfid-PNA die größte Selektivität aller getesteten Spaltreagenzien (Spaltungsgeschwindigkeit der ssPNA / Spaltungsgeschwindigkeit der PNA / DNA-Duplex = 33). Dieses einfache chemische System ist damit bemerkenswerter Weise selektiver als typische unselektive Nukleasen. Phosphodiesterase I z. B. hydrolysiert ssDNA-Substrate fünfmal schneller als dsDNA-Substrate<sup>[52]</sup> und unspezifische Endonukleasen besitzen eine vergleichbare Substrat-Selektivität<sup>[53]</sup>.

## 4. Zusammenfassung

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden durch DNA-Template gesteuerte Reaktionen chemisch modifizierter Peptidnukleinsäuren untersucht. Zunächst wurden am N-Ende estermodifizierte PNAs und am C-Ende Chelatliganden-modifizierte PNAs synthetisiert. Die die Estergruppe enthaltende PNA und die Metall-Komplex-PNA binden an benachbarte Stellen in einem komplementären DNA-Templat. Dies bringt die reagierenden Gruppen (den Ester und den  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplex) in räumliche Nähe zueinander, und die Hydrolyse wird durch das Templat um einen Faktor von  $\sim 500$  beschleunigt. Eine  $> 10^2$ -fache Diskriminierung zwischen komplementärer DNA und DNA, die eine Fehlbasenpaarung bildet, wird erreicht. Das natürliche Enzym T4 DNA Ligase ist etwas weniger selektiv. Auf der Basis dieser Reaktion wurde eine homogene, empfindliche (10 fmol DNA) Analysenmethode zur sequenzspezifischen Detektion von DNA entwickelt. Die Methode ist auch in Gegenwart kompetitiver Liganden anwendbar, die z. B. in PCR-Medien (ATP u. a.) und physiologischen Puffern enthalten sind.

Es konnte außerdem gezeigt werden, daß die  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplex-katalysierte Ester-Spaltung nicht nur durch ein Einzelstrang-DNA-Templat, sondern auch durch ein Doppelstrang-DNA-Templat beschleunigt werden kann. Die Spaltung erfolgt zu Beginn der Reaktion in Anwesenheit des Templats 7-mal schneller als in Abwesenheit des dsDNA-Templats. Die Erkennung von „mismatches“ ist mit dieser Reaktion ebenfalls möglich.

In einem weiteren Projekt wurde die Spaltung von PNAs, die intern mit einer Disulfid-Gruppe modifiziert sind, in Abhängigkeit von der Hybridisierung mit komplementärer DNA untersucht. Dabei wurde eine Reihe von Phosphinen und Thiolen als Spaltreagenzien getestet, die unterschiedliche Größen und Ladungen besitzen. Das Spaltreagenz mit der größten Selektivität, Tris-(carboxyethyl)-phosphin, zeigte für die Einzelstrang-PNA eine 33-fach höhere Reaktivität als für die PNA / DNA-Duplex. Die Selektivität der Reaktion wird durch elektrostatische Abstoßung zwischen dem Phosphin-tricarboxylat und der negativ geladenen PNA / DNA-Duplex erklärt.

## 5. Experimenteller Teil

### 5.1. Geräte und Chemikalien

Die Chemikalien wurden von Acros (Geel, Belgien), Aldrich / Sigma / Fluka (Deisenhofen, Deutschland), Advanced Chemtech (Louisville, KY) und Novabiochem (Läufelfingen, Schweiz) geliefert und ohne weitere Reinigung verwendet. HPLC-gereinigte DNA wurde von Metabion (Plannegg-Martinsried, Deutschland) geliefert. Für die Templat-Reaktionen wurden folgende Puffer verwendet: Puffer A – MOPS 10 mM pH 7 und NaCl 50 mM; Puffer B – ATP 200  $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, KCl 50 mM; Puffer C – Phosphat-Puffer 10 mM pH 7, NaCl 150 mM. Die Reagenzien für die PNA-Synthesen wurden von PerSeptiv Biosystems (Hamburg, Deutschland) geliefert.

Die MALDI-TOF-Massenspektren wurden auf einem Bruker BIFLEX III Spektrometer aufgenommen. Für MALDI-TOF-Analysen der PNA-Konjugate wurde eine Lösung von 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure (27 mM, TFA 0,1 %, CH<sub>3</sub>CN 33,9 % / MeOH 33 % / H<sub>2</sub>O 33 %) als Matrix verwendet. Die Proben für die Massenspektrometrie wurden auf einer Bruker MAP II Proben-Präparations-Station mit der „dried droplet“-Methode präpariert. Dabei wurde für Wasser- und Wasser / CH<sub>3</sub>CN-Lösungen (HPLC-Fraktionen) ein Probe / Matrix-Verhältnis von 1 / 2 verwendet. Für TFA / m-Cresol-Lösungen (4 / 1) wurden Probe und Matrix in einem Verhältnis von 1 / 20 verwendet. Die Genauigkeit der Masse mit externer Kalibrierung betrug 0,1 % der Peak-Masse, z. B.  $\pm$  3,0 bei m / z 3000.

Die präparativen und analytischen HPLC-Messungen wurden bei 49 °C an einem Shimadzu Flüssigkeits-Chromatographen durchgeführt, der mit einem UV-VIS-Detektor und einem Säulen-Ofen ausgerüstet ist. Als Säule wurde eine Machery-Nagel Nucleosil C4 250 x 4,6 mm Säule mit einem Gradienten von CH<sub>3</sub>CN (0,1 % TFA, Lsgsm. B) in Wasser (0,1 % TFA, Lsgsm. A) verwendet: 49 °C, 0 % B für 5 min, in 30 min zu 35 % B, in 10 min zu 90 % B, 90 % B für 10 min. Die für die HPLC-Untersuchungen verwendeten Lösungsmittel besaßen einen Reinheitsgrad von > 99,8 %. Für die HPLC-Reinigung der PNA- und DNA-Konjugate wurde eine 500  $\mu$ l-Injektionsschleife benutzt, für alle anderen Experimente wurde eine 20  $\mu$ l-Injektionsschleife verwendet.

Die Schmelzpunktexperimente wurden auf einem Varian Cary 100 Bio UV-VIS Spektrophotometer durchgeführt, wobei die Absorption bei 260 nm in schwarzwändigen Semimikroküvetten mit einem Probenvolumen von 0,7 ml gemessen wurde.

## 5.2. Synthesen der Ligand-PNA- und Ester-PNA-Konjugate für die DNA-Templat-gesteuerte Esterhydrolyse

Die Synthesen der PNA-Teile der Konjugate (**Schema 3**, PNA **2** und PNA **7**) wurden an einem Expedite 8909 PNA / DNA Syntheseautomaten durchgeführt, der vom Hersteller für 2  $\mu$ molare Ansätze empfohlen wird. An den C-Terminus der PNA wurde durch Umsetzung mit Fmoc-Lys(Boc)-OH ein Lysin gekoppelt, um die Löslichkeit der PNA in wässrigen Puffersystemen zu erhöhen.

*PNA 6a.* Bromacetyl bromid (8,6  $\mu$ l, 100  $\mu$ mol) wurde in DMF (1 ml) gelöst und mit DIEA (38  $\mu$ l, 200  $\mu$ mol) gemischt. Die erhaltene dunkle Lösung wurde zu der festphasengebundenen PNA **2** (~2  $\mu$ mol terminale NH<sub>2</sub>-Gruppen) gegeben und die entstehende Suspension 30 min bei 22 °C in einem automatischen Mixer mit Temperaturkontrolle geschüttelt. Das Stoffgemisch wurde gefiltert, der Rückstand mit DMF (2 x 2 ml) und CH<sub>3</sub>CN (2 x 2 ml) gewaschen und anschließend bei 0,01 mbar getrocknet. Ein geringer Teil des Polymers (PNA **3**; 2-3 Kügelchen) wurde 90 min mit TFA / m-Cresol (4 / 1, V / V, 20  $\mu$ l) behandelt und die erhaltene Lösung anschließend mit einem MALDI-TOF-Massenspektrometer analysiert. Die Ausgangsverbindung konnte nicht detektiert werden, wohingegen die bromacetylierte PNA **3** bei 2655,0 erschien (für C<sub>104</sub>H<sub>136</sub>N<sub>54</sub>BrO<sub>27</sub> [M+H]<sup>+</sup> berechnet: 2655,5).

Aminoethanol (22  $\mu$ l, 350  $\mu$ mol) und DIEA (61,3  $\mu$ l, 350  $\mu$ mol) wurden in DMF (1 ml) gelöst und zu der polymergebundenen PNA **3** gegeben. Nach 24-stündigem Schütteln bei 22 °C wurde das Produkt wie in der Synthese von PNA **3** beschrieben aufgearbeitet und analysiert. Die Eduktverbindung wurde nicht detektiert, die aminmodifizierte PNA **4** erschien bei 2631,7 (für C<sub>106</sub>H<sub>142</sub>N<sub>55</sub>O<sub>28</sub> [M+H]<sup>+</sup> berechnet: 2634,6).

1-Thyminessigsäure (37 mg, 200  $\mu$ mol), HBTU (68 mg, 180  $\mu$ mol) und HOBT (28mg, 200  $\mu$ mol) wurden 30 min bei 0,01 mbar getrocknet und in DMF (1 ml) gelöst. Dann wurde DIEA (76  $\mu$ l, 400  $\mu$ mol) zugegeben und die entstehende, leicht dunkle Lösung zu der festphasengebundenen PNA **4** gegeben. Die Suspension wurde 60 min bei 22 °C geschüttelt. Das entstandene Produkt wurde wie in der Synthese von PNA **3** beschrieben aufgearbeitet und analysiert. Die Ausgangsverbindung konnte nicht detektiert werden, wohingegen die O,N-diacetylierte Produkt-PNA bei 2964,2 erschien (für C<sub>120</sub>H<sub>154</sub>N<sub>59</sub>O<sub>34</sub> [M+H]<sup>+</sup> berechnet: 2967,9). Das erhaltene Produkt wurde 24 h mit wässrigem Ammoniak (25 %) behandelt und



in der üblichen Weise aufgearbeitet und analysiert. Edukt wurde nicht detektiert, die entschützte PNA **5** erschien bei 2800,3 (für  $C_{113}H_{148}N_{57}O_{34}$   $[M+H]^+$  berechnet: 2801,8).

Picolinsäure (25 mg, 200  $\mu$ mol) und HOBT (28 mg, 200  $\mu$ mol) wurden 30 min bei 0,01 mbar getrocknet und dann in DMF (1 ml) gelöst. Anschließend wurde erst DIC (31  $\mu$ l, 200  $\mu$ mol), dann DMAP (1,2 mg, 10  $\mu$ mol) zugegeben. Nachdem sich das DMAP vollständig gelöst hatte, wurde die erhaltene Lösung zu der polymergebundenen PNA **5** gegeben, die zuvor 24 h bei 0,01 mbar getrocknet worden war. Die Suspension wurde 3 h bei 22 °C gemischt und dann nach der Standard-Methode aufgearbeitet. Die erhaltene PNA **6** wurde mit TFA / m-Cresol (4 / 1, V / V, 150  $\mu$ l) von der Festphase abgespalten und entschützt, anschließend mit Diethylether (2,5 ml) gefällt, filtriert und mit Diethylether (2 x 1 ml) gewaschen. Nach dem Trocknen (0,01 mbar) wurde das Produkt in Wasser gelöst und mit Hilfe von HPLC gereinigt. PNA **6a**: HPLC, 49 °C, 2 % B für 5 min, in 30 min zu 35 % B, in 10 min zu 90 % B, 90 % B für 10 min:  $R_t = 26,0$  min Ausbeute: 2,9 %. MALDI-TOF MS für  $C_{119}H_{150}N_{58}O_{32}$   $[M+H]^+$ : berechnet 2905,9; gefunden 2903,7.

PNA **6b** wurde analog synthetisiert.

PNA **6b**: HPLC, 49 °C, 2 % B für 5 min, in 30 min zu 35 % B, in 10 min zu 90 % B, 90 % B für 10 min:  $R_t = 29,7$  min Ausbeute: 3,5 %. MALDI-TOF MS für  $C_{172}H_{276}N_{86}O_{46}$   $[M+H]^+$ : berechnet 4225,1; gefunden 4225,0.

*PNA 9*. N-Methyl-2-imidazolylcarbonsäure (25 mg, 200  $\mu$ mol) und HOBT (28 mg, 200  $\mu$ mol) wurden 30 min bei 0,01 mbar getrocknet, in DMF (1 ml) gelöst und anschließend erst mit DIC (31  $\mu$ l, 200  $\mu$ mol) dann mit DMAP (1,2 mg, 10  $\mu$ mol) gemischt. Nach kompletter Auflösung des DMAPs wurde die erhaltene Lösung zu der festphasengebundenen PNA **8** gegeben, entsprechend der angegebenen Vorschrift<sup>[21]</sup>. Die Suspension wurde 3 h bei 22 °C geschüttelt und in der üblichen Weise aufgearbeitet. Die so erhaltene PNA **9** wurde unter Verwendung von TFA / m-Cresol (4 / 1, V / V, 150  $\mu$ l) von der Festphase abgespalten und entschützt, mit Diethylether (2,5 ml) gefällt, filtriert und mit Diethylether (2 x 1 ml) gewaschen. Dann wurde das Produkt getrocknet, in Wasser gelöst und HPLC-gereinigt. PNA **9**: HPLC, 49 °C, 2 % B für 5 min, in 30 min zu 35 % B, in 10 min zu 90 % B, 90 % B für 10 min:  $R_t = 22,0$  min Ausbeute: 4,5 %. MALDI-TOF MS für  $C_{110}H_{143}N_{56}O_{30}$   $[M+H]^+$ : berechnet 2728,1; gefunden 2730,4.

Die PNAs **11a-c** wurden analog synthetisiert, nur daß zur deren Synthese anstelle von PNA **8** die ebenfalls festphasengebundene PNA **10**<sup>[22]</sup> verwendet wurde.

PNA **11a-C**: HPLC, 49 °C, 2 % B für 5 min, in 30 min zu 35 % B, in 10 min zu 90 % B, 90 % B für 10 min:  $R_t = 21,0$  min Ausbeute: 12,3 %. MALDI-TOF MS für  $C_{109}H_{141}N_{56}O_{29}$   $[M+H]^+$ : berechnet 2700,0; gefunden 2699,4.

PNA **11a-T**: HPLC, 49 °C, 2 % B für 5 min, in 30 min zu 35 % B, in 10 min zu 90 % B, 90 % B für 10 min:  $R_t = 21,0$  min Ausbeute: 12,3 %. MALDI-TOF MS für  $C_{110}H_{142}N_{55}O_{30}$   $[M+H]^+$ : berechnet 2714,0; gefunden 2714,4.

PNA **11a-A**: HPLC, 49 °C, 2 % B für 5 min, in 30 min zu 35 % B, in 10 min zu 90 % B, 90 % B für 10 min:  $R_t = 21,0$  min Ausbeute: 12,3 %. MALDI-TOF MS für  $C_{110}H_{140}N_{58}O_{28}$   $[M+H]^+$ : berechnet 2722,9; gefunden 2723,6.

PNA **11a-G**: HPLC, 49 °C, 2 % B für 5 min, in 30 min zu 35 % B, in 10 min zu 90 % B, 90 % B für 10 min:  $R_t = 21,0$  min Ausbeute: 12,3 %. MALDI-TOF MS für  $C_{110}H_{141}N_{58}O_{29}$   $[M+H]^+$ : berechnet 2738,8; gefunden 2740,7.

PNA **11b-C**: HPLC, 49 °C, 2 % B für 5 min, in 30 min zu 35 % B, in 10 min zu 90 % B, 90 % B für 10 min:  $R_t = 23,4$  min Ausbeute: 5,4 %. MALDI-TOF MS für  $C_{108}H_{141}N_{54}O_{32}$   $[M+H]^+$ : berechnet 2708,6; gefunden 2706,2.

PNA **11b-T**: HPLC, 49 °C, 2 % B für 5 min, in 30 min zu 35 % B, in 10 min zu 90 % B, 90 % B für 10 min:  $R_t = 23,4$  min Ausbeute: 5,4 %. MALDI-TOF MS für  $C_{109}H_{142}N_{53}O_{33}$   $[M+H]^+$ : berechnet 2723,6; gefunden 2721,2.

PNA **11b-A**: HPLC, 49 °C, 2 % B für 5 min, in 30 min zu 35 % B, in 10 min zu 90 % B, 90 % B für 10 min:  $R_t = 23,4$  min Ausbeute: 5,4 %. MALDI-TOF MS für  $C_{109}H_{140}N_{56}O_{31}$   $[M+H]^+$ : berechnet 2731,7; gefunden 2730,2.

PNA **11b-G**: HPLC, 49 °C, 2 % B für 5 min, in 30 min zu 35 % B, in 10 min zu 90 % B, 90 % B für 10 min:  $R_t = 23,4$  min Ausbeute: 5,4 %. MALDI-TOF MS für  $C_{109}H_{141}N_{56}O_{32}$   $[M+H]^+$ : berechnet 2748,7; gefunden 2746,1.

PNA **11c**: HPLC, 49 °C, 2 % B für 5 min, in 30 min zu 35 % B, in 10 min zu 90 % B, 90 % B für 10 min:  $R_t = 24,3$  min Ausbeute: 4,7 %. MALDI-TOF MS für  $C_{119}H_{158}N_{49}O_{40}$   $[M+H]^+$ : berechnet 2915,8; gefunden 2914,6.

Die PNAs **12** und **13** wurden entsprechend der Literatur<sup>[23]</sup> synthetisiert.

PNA **16a**<sup>[23]</sup>. Fmoc-Lys(Alloc)-OH (45 mg, 100  $\mu$ mol), HBTU (34 mg, 90  $\mu$ mol) und HOBT (14 mg, 100  $\mu$ mol) wurden 30 min bei 0,01 mbar getrocknet, in DMF (1 ml) gelöst und dann

mit DIEA (38  $\mu$ l, 200  $\mu$ mol) versetzt. Die entstandene Lösung wurde zu der Festphase **1** gegeben, die Suspension 60 min bei 22 °C geschüttelt und wie in der Synthese von PNA **3** beschrieben aufgearbeitet, was zu Verbindung **14** führte (**Schema 4**). Anschließend wurde die Fmoc-Schutzgruppe durch 40-minütigen Umsatz mit „PNA-deblock-solution“ (Piperidin / DMF, 1 / 4, V / V, 1 ml) abgespalten. Dann wurde das Gemisch in der üblichen Weise aufgearbeitet. Nun wurden 2-(5-Carboxypyrazolyl)-pyridin (3,8 mg, 20  $\mu$ mol), (6,8 mg, 18  $\mu$ mol) und HOBT (2,8 mg, 20  $\mu$ mol) 30 min bei 0,01 mbar getrocknet, in DMF (1 ml) gelöst und dann mit DIEA (5,6  $\mu$ l, 40  $\mu$ mol) versetzt. Die entstandene Lösung wurde zu der Festphase gegeben, die Suspension 60 min bei 22 °C geschüttelt und in der üblichen Weise aufgearbeitet, was Verbindung **15** lieferte.

Dann wurden Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (5 mg, 4,3  $\mu$ mol) und Triphenylphosphin (1 mg, 3,8 mmol) 30 min bei 0,01 mmbar getrocknet und unter Argon-Atmosphäre in Dichlormethan (0,5 ml) gelöst. Diethylammonium-hydrogencarbonat (5 mg, 38  $\mu$ mol) wurde ebenfalls im Vakuum getrocknet und unter Schutzgas in Dichlormethan (0,5 ml) gelöst. Die beiden Mischungen wurden zusammengegeben und zu der festphasengebundenen Verbindung **15** gegeben. Die Suspension wurde 3 h bei 22 °C geschüttelt und anschließend in der üblichen Weise aufgearbeitet. Das erhaltene Produkt wurde mittels TFA / m-Cresol (4 / 1, V / V, 150  $\mu$ l) von der Festphase abgespalten und entschützt, mit Diethylether (2,5 ml) gefällt, filtriert und mit Diethylether (2 x 1 ml) gewaschen. Dann wurde das Produkt getrocknet, in Wasser gelöst und HPLC-gereinigt.

PNA **16a**: HPLC, 49 °C, 2 % B für 5 min, in 30 min zu 35 % B, in 10 min zu 90 % B, 90 % B für 10 min:  $R_t$  = 23,8 min Ausbeute: 4,2 %. MALDI-TOF MS für  $C_{98}H_{125}N_{54}O_{23}$   $[M+H]^+$ : berechnet 2426,4; gefunden 2426,0.

PNA **16b** wurde analog zu PNA **16a** hergestellt.

PNA **16b**: HPLC, 49 °C, 2 % B für 5 min, in 30 min zu 35 % B, in 10 min zu 90 % B, 90 % B für 10 min:  $R_t$  = 22,9 min Ausbeute: 3,1 %. MALDI-TOF MS für  $C_{125}H_{167}N_{54}O_{37}$   $[M+H]^+$ : berechnet 3019,0; gefunden 3018,2.

### 5.3. Synthesen der intern Disulfid-modifizierten PNAs

#### Synthese der PNA **43a**

Die Synthese der PNA-Teile der Konjugate (**Schema 7**, Schritte a und d) wurde an einem Expedite 8909 PNA / DNA-Syntheseautomaten durchgeführt, der vom Hersteller für 2  $\mu$ molare Ansätze empfohlen wird. An die Enden der PNA wurden mit Hilfe von Fmoc-Lys(Boc)-OH zwei Lysin-Reste eingeführt, um die Wasserlöslichkeit der PNA zu erhöhen.

**PNA 41.** Carbonyldiimidazol (16,2 mg, 100  $\mu$ mol) wurde in DMSO (1 ml) gelöst und zu der festphasengebundenen PNA **40** (1,2  $\mu$ mol terminale Aminogruppen) gegeben. Dann wurde die Suspension unter Verwendung eines automatischen Mixers mit Temperatur-Kontrolle 24 h bei 22 °C gemischt. Das Stoffgemisch wurde gefiltert, die feste Phase mit DMSO (2 x 2 ml) und CH<sub>3</sub>CN (2 x 2 ml) gewaschen und anschließend 2 h im Vakuum (0,02 mbar) getrocknet. Ein geringer Teil des Polymers (2-3 Kügelchen) wurden 90 min lang mit TFA / m-Cresol (4 / 1, V / V, 50  $\mu$ l) behandelt und die entstehende Lösung mit einem MALDI-TOF-Massenspektrometer analysiert. MALDI-TOF MS für C<sub>64</sub>H<sub>82</sub>N<sub>35</sub>O<sub>15</sub> [M+H]<sup>+</sup>: berechnet 1583,6; gefunden 1582,6. Für die unmodifizierte PNA **40** (FW = 1488,5) wurde kein Peak detektiert.

**PNA 42.** Cystamin-dihydrochlorid (22,5 mg, 100  $\mu$ mol) und Diisopropylethylamin (36  $\mu$ l, 220  $\mu$ mol) wurden unter starkem Schütteln in DMSO (1ml) gelöst. Diese Lösung wurde zu PNA **41** gegeben und das entstehende Stoffgemisch unter Verwendung eines automatischen Mixers mit Temperaturkontrolle 24 h bei 22 °C gemischt. Dann wurde die Suspension gefiltert, die feste Phase mit DMSO (2 x 2 ml) und CH<sub>3</sub>CN (2 x 2 ml) gewaschen und anschließend 2 h im Vakuum (0,02 mbar) getrocknet. Ein geringer Teil des Polymers (2-3 Kügelchen) wurde 90 min lang mit TFA / m-Cresol (4 / 1, V / V, 50  $\mu$ l) behandelt und die entstehende Lösung mit einem MALDI-TOF-Massenspektrometer analysiert. MALDI-TOF MS für C<sub>65</sub>H<sub>92</sub>N<sub>35</sub>O<sub>15</sub>S<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: berechnet 1667,8; gefunden 1669,7. Für die Edukt-PNA **41** (FW = 1583,6) wurde kein Peak detektiert.

Das festphasengebundene PNA-Konjugat (0,5 – 1,2  $\mu$ mol) wurde 90 min lang mit einer TFA / m-Cresol-Mischung (4 / 1, V / V, 50  $\mu$ l) behandelt. Die Festphase wurde abfiltriert und das Filtrat mit Diethylether (2,5 ml) gemischt. Der entstehende Niederschlag wurde gefiltert, mit Diethylether (2 x 1 ml) gewaschen, getrocknet (0,01 mbar) und anschließend HPLC-gereinigt.

Verbindung **43a**. HPLC, 49 °C, 2 % B für 5 min, in 30 min zu 35 % B, in 10 min zu 90 % B, 90 % B für 10 min:  $R_t = 24,5$  min. Ausbeute: 4,5 %. MALDI-TOF MS für  $C_{125}H_{171}N_{68}O_{30}S_2$   $[M+H]^+$ : berechnet 3171,3; gefunden 3169,4.

Die festphasengebundenen PNAs **43b** und **43c** wurden analog synthetisiert.

Verbindung **43b**. HPLC, 49 °C, 2 % B für 5 min, in 30 min zu 35 % B, in 10 min zu 90 % B, 90 % B für 10 min:  $R_t = 26,1$  min. Ausbeute: 2,2 %. MALDI-TOF MS für  $C_{190}H_{250}N_{105}O_{47}S_2$   $[M+H]^+$ : berechnet 4821,9; gefunden 4821,2.

Verbindung **43c**. HPLC, 49 °C, 2 % B für 5 min, in 30 min zu 35 % B, in 10 min zu 90 % B, 90 % B für 10 min:  $R_t = 26,3$  min. Ausbeute: 3,3 %. MALDI-TOF MS für  $C_{189}H_{253}N_{94}O_{53}S_2$   $[M+H]^+$ : berechnet 4754,8; gefunden 4753,4.

## 5.4. Durchführung der Schmelzpunktuntersuchungen

Zum Messen der Schmelzpunkte sind folgende Konzentrationen notwendig:

MOPS: 10 mM      NaCl: 50 mM      DNA: 2  $\mu$ M      PNA: 2  $\mu$ M.

Das Gesamtvolumen der Meßküvette beträgt 700  $\mu$ l.

### *Konzentrationsbestimmung der Oligonukleotide*

Um die Konzentration der Oligonukleotide zu bestimmen, werden zunächst die Absorptionen der PNA-Lösungen durch UV-Messung bei  $\lambda = 260$  nm ermittelt. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes

$$A = \epsilon c d$$

A: Absorption (dimensionslos);       $\epsilon$ : molarer Extinktionskoeffizient ( $l \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ );  
c: Konzentration des Oligonucleotids ( $\text{mol l}^{-1}$ ); d: Dicke der UV-Küvette (cm).

kann dann bei bekannter Küvettendicke und bekanntem molaren Extinktionskoeffizienten die Konzentration ermittelt werden.

Der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  kann bei bekannter Basenzusammensetzung mit Hilfe der folgenden Formel berechnet werden:

$$\epsilon = n \epsilon(A) + m \epsilon(C) + l \epsilon(G) + k \epsilon(T)$$

n: Anzahl der Adeninbasen im Oligonukleotid	$\epsilon(A) = 13700 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
m: Anzahl der Cytosinbasen im Oligonukleotid	$\epsilon(C) = 6600 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
l: Anzahl der Guaninbasen im Oligonukleotid	$\epsilon(G) = 11700 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
k: Anzahl der Thyminbasen im Oligonukleotid	$\epsilon(T) = 8600 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

### *Schmelzpunktmessung*

Nachdem die Konzentration der PNA UV-spektroskopisch bestimmt wurde, werden PNA, DNA, NaCl, MOPS und Wasser so in einer Küvette gemischt, daß sich bei dem Endvolumen von 700  $\mu$ l die anfangs bereits angegebenen Konzentrationen ergeben.

Nun wird die Abhängigkeit der Absorption von der Temperatur bestimmt, indem man in dem gewünschten Temperaturmessbereich in Schritten von 0,5  $^{\circ}$ C pro Minute heizt bzw. abkühlt. Die Messung (Heiz- und Abkühlvorgang) wird mindestens zweimal wiederholt. Die Küvetten

werden während der Messung von außen von Stickstoff umspült, um zu vermeiden, daß das Küvettenglas aufgrund von Kondensation beschlägt. Die Schmelzpunkte sind Durchschnittswerte der Maxima der ersten Ableitung der 61-fach geglätteten Kurven von mindestens 2 Kühl- und 2 Heizkurven.

## **5.5. MALDI-TOF-massenspektrometrische Untersuchungen der Ester-Hydrolyse**

### **5.5.1. Ester-Hydrolyse am Einzelstrang-DNA-Templat**

Für die Ester-Hydrolyse am Einzelstrang-DNA-Templat wird eine Lösung aus PNA **6a** (1  $\mu\text{M}$ ) und  $\text{CuSO}_4$  (1  $\mu\text{M}$ ) in Pufferlösung (MOPS 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7) hergestellt. Diese Mischung läßt man 24 h bei 22 °C stehen, um eine Äquilibrierung zu ermöglichen. Dann wird eine äquimolare Mischung der vier PNAs **11b** (Endkonzentration: jeweils 5  $\mu\text{M}$ ) zugegeben. Durch Zugabe der Templat-DNA **21** (Endkonzentration: 1  $\mu\text{M}$ ) wird die Reaktion gestartet. Zu definierten Zeitpunkten werden Proben (1  $\mu\text{l}$ ) entnommen und mit der 3,5-Dimethoxyzimtsäure-Matrix (2  $\mu\text{l}$ ) gemischt. Die entstehende Mischung wird auf eine MALDI-Platte getüpfelt und zum Trocknen stehen gelassen. Die so präparierten Proben werden dann mit dem MALDI-TOF-Massenspektrometer analysiert. Jede Reaktion wurde mindestens dreimal wiederholt.

### **5.5.2. Ester-Hydrolyse am Doppelstrang-DNA-Templat**

Für die Ester-Hydrolyse am Doppelstrang-DNA-Templat wird eine Lösung aus PNA **14b** (1  $\mu\text{M}$ ) und  $\text{CuSO}_4$  (1  $\mu\text{M}$ ) in Pufferlösung (MOPS 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7) hergestellt. Diese Mischung läßt man 24 h bei 22 °C stehen, um eine Äquilibrierung zu ermöglichen. Dann wird PNA **11c** (Endkonzentration: 1  $\mu\text{M}$ ) zugegeben. Durch Zugabe der Templat-DNA-Duplex DNA **34** : DNA **37** (Endkonzentration: 1  $\mu\text{M}$ ) wird die Reaktion gestartet. Zu definierten Zeitpunkten werden Proben (1  $\mu\text{l}$ ) entnommen und mit der 3,5-Dimethoxyzimtsäure-Matrix (2  $\mu\text{l}$ ) gemischt. Die entstehende Mischung wird auf eine MALDI-Platte getüpfelt und zum Trocknen stehen gelassen. Die so präparierten Proben werden dann mit dem MALDI-TOF-Massenspektrometer analysiert. Jede Reaktion wurde mindestens dreimal wiederholt.



## **5.6. Untersuchungen der Ester-Hydrolyse mit Hilfe von HPLC**

### **5.6.1. Ester-Hydrolyse am Einzelstrang-DNA-Templat**

Für die Esterhydrolyse am Einzelstrang-DNA-Templat stellt man eine Lösung (30-60  $\mu$ l) der Ester-PNA (1  $\mu$ M) und  $\text{CuSO}_4$  (1  $\mu$ M) in Pufferlösung (MOPS 10 mM pH 7, NaCl 50 mM) her. Diese Mischung lässt man 24 h bei 22 °C ruhen, um eine Äquilibrierung zu ermöglichen. Dann wird die Katalysator-PNA (PNA-L; Endkonzentration: 5  $\mu$ M) zugegeben. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe der Templat-DNA (Endkonzentration: 1  $\mu$ M) gestartet. Zu definierten Zeitpunkten werden Proben (15  $\mu$ l) zur HPLC-Analyse entnommen.

### **5.6.2. Ester-Hydrolyse am Doppelstrang-DNA-Templat**

Für die Esterhydrolyse am Doppelstrang-DNA-Templat wird eine Lösung (30-60  $\mu$ l) aus Ester-PNA **14b** (1  $\mu$ M) und  $\text{CuSO}_4$  (1  $\mu$ M) in MOPS-Puffer (10 mM pH 7) hergestellt und 24 h bei 22 °C stehengelassen, um eine Äquilibrierung zu ermöglichen. Dann wird die PNA-L **11c** (Endkonzentration: 1  $\mu$ M) zugegeben. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe der Templat-DNA-Duplex DNA **34** : DNA **37** (Endkonzentration: 1  $\mu$ M) gestartet. Zu definierten Zeitpunkten werden Proben (15  $\mu$ l) zur HPLC-Analyse entnommen.

## **5.7. Untersuchungen der Disulfidspaltung mit Hilfe von HPLC**

### **5.7.1. Spaltung der PNAs 43a-c mit Phosphinen**

Man stellt eine Lösung (30-60  $\mu$ l) aus PNA (2  $\mu$ M), DNA (0-30  $\mu$ M) und MOPS-Puffer (pH 7, 10 mM) in CH<sub>3</sub>CN / H<sub>2</sub>O her und läßt diese mindestens 2 h bei 22 °C stehen, um die Ausbildung der thermodynamisch stabilsten PNA / DNA-Duplex zu gewährleisten. Das Phosphin (0,2 mM Endkonzentration) wird zugegeben und mehrere Proben (15  $\mu$ l) zur HPLC-Analyse entnommen (**Tab. 4**). Alle Lösungsmittel, die für diese Experimente verwendet wurden, wurden mit Argon gespült.

### **5.7.2. Spaltung der PNAs 43a-c mit Thiolen**

Die Spaltexperimente wurden analog zu denen mit Phosphinen durchgeführt, nur daß die Thiole in höheren Konzentrationen (2 mM) als die Phosphine verwendet wurden, da diese bei pH 7 eine geringere Spaltgeschwindigkeit haben.

## Literaturverzeichnis

- [1] J. K. Bashkin, L. A. Jenkins, *Comments Inorg.Chem.* **1994**, *16*, 77.
- [2] W. Kaim, B. Schwederski, *Bioanorganische Chemie* **1995**, B.G. Teubner Stuttgart.
- [3] Stryer, Lubert, *Biochemie* **1999**, Spektrum-Verlag.
- [4] J. Craig Venter et al., The Sequence of the Human Genome, *Science* **2001**, *291*, 1304.
- [5] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, *254*, 1497.
- [6] M. Eriksson, P. E. Nielsen, *Nat. Strut. Biol.* **1996**, *3*, 410.
- [7] L. Betts, J. A. Josey, J. M. Veal, S. R. Jordan, *Science* **1995**, *270*, 1838.
- [8] V. Demidov, V. N. Potaman, M. D. Frank-Kamenetskii, M. Egholm, O. Buchardt, S. H. Sonnichsen, P. E. Nielsen, *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 1310.
- [9] M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1895.
- [10] B. Lewin, *Genes* **1997** Oxford University Press.
- [11] B. Lewin, *Genes* **1998** Oxford University Press.
- [12] E. Uhlmann, A. Peyman, *Chem. Rev.* **1990**, *90(4)*, 561.
- [13] E. Uhlmann, A. Peyman, *Chem. Rev.* **1990**, *90(4)*, 544.
- [14] M. Bower, M. F. Summers, C. Powell, K. Shinozuka, J. B. Regan G. Zon, W. D. Wilson, *Nucleic Acid Res.* **1987**, *15*, 4915.

- [15] M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **1988**, *60*(20), 2299.
- [16] R. K. Altman, I. Schwöpe, D. A. Sarracino, C. N. Tetzlaff, C. F. Bleczynski, C. Richert, *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 493.
- [17] B. Schweitzer, S. Kingsmore, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 21.
- [18] R. Naylor, P. T. Gilham, *Biochemistry* **1966**, *5*, 2722.
- [19] G. von Kiedrowski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1986**, *25*, 932.
- [20] Review: a) D. Summerer, A. Marx, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 93, (b) Y. Gat, D. G. Lynn, *Templated Org. Synthesis* **2000**, 133, (c) Y. Gat, D. G. Lynn, *Biopolymers* **1998**, *48*(1), 19. Produkt-Inhibierung in Templat-gesteuerten Reaktionen: d) J. Ye, Y. Gat, D. G. Lynn, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3787; e) P. Luo, J. C. Leitzel, Zh.-Y. J. Zhan, D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3019; f) Zh.-Y. J. Zhan, D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12420. Templat-gesteuerte Reaktionen in der organischen Synthese (ausgewählte Referenzen): g) M. W. Kanan, M. M. Rozenman, K. Sukarai, T. M. Snyder, D. R. Liu, *Nature* **2004**, *431*, 545; h) Z. J. Gartner, B. N. Tse, R. Grubina, J. B. Doyon, T. M. Snyder, D. R. Liu, *Science* **2004**, *305*, 1601. Templat-gesteuerte Synthesen von Metallosalen-Konjugaten (ausgewählte Referenzen): i) J. L. Czapinski, T. L. Sheppard, *ChemBioChem* **2004**, *5*(1), 127; j) J. L. Czapinski, T. L. Sheppard, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8618. Templat-gesteuerte Reaktionen in selbst-replizierenden Reaktionen (ausgewählte Referenzen): k) L.-E. Orgel, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 109; l) B. G. Bag, G. von Kiedrowski, *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*(11), 2145. Templat-inhibierte Reaktionen: m) I. Boll, R. Krämer, A. Mokhir, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*(3), 505.
- [21] a) Y. Xu, N. B. Karalkar, E. T. Kool, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 148; b) S. Sando, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*(10), 2096; c) H. Abe, E.T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13980; d) S. Sando, H. Abe, E.T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1081.

- [22] a) Zh. Mar, J.-S. Taylor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *9(21)*, 11159-11163; b) Zh. Mar, J.-S. Taylor, *Bioconj. Chem.* **2003**, *14*, 679-683; c) J. Cai, X. Li, X. Yue, J.-S. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16324.
- [23] J. Brunner, A. Mokhir, R. Krämer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125(41)*, 12410.
- [24]  $\text{Log}(K_{\text{formation}}(\text{Cu--pyridine})) = 2,6$ : J. Ambrose, A. Covington, H. Thirsk, *Trans. Faraday Soc.* **1970**, *65*, 1897;  $\text{Log}(K_{\text{formation}}(\text{Cu--N-methylimidazole})) = 4,2$ : A. Agafonova, I. Agafonov, *Zhur. Phys. Khim.* **1954**, *27*, 1137.
- [25] a) P. L. Ross, K. Lee, P. Belgrader, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4197; b) A. Mattes, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40(17)*, 3178; c) S. Ficht, A. Mattes, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9970.
- [26] N. G. Dolinnaya, O. V. Pyatrauskene, Z. A. Shabarova, *FEBS Lett.* **1991**, *284(2)*, 232.
- [27] K. J. Luebke, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8733.
- [28] J. Sambrook, D. W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, New York, **2001**.
- [29] J. Stoerker, J. D. Mayo, C. N. Tetzlaff, D. A. Saracino, I. Schwöpe, C. Richert, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18(11)*, 1213.
- [30] P. E. Nielsen, M. Egholm, *Peptide Nucleic Acids Protocols and Applications*; P. E. Nielsen, M. Egholm, Eds.; Horizon Scientific: England, **1999**, pp 1-19.
- [31] S. Ficht, A. Mattes, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9970.
- [32] A. J. Parker, N. Kharasch, *Chem. Rev.* **1963**, *59*, 583.
- [33] A. Cahours, A. W. Hoffmann, *Justus Liebig Ann. Chem.* **1857**, *104(12)*, 23.
- [34] C. Moore, B. Trego, *Tetrahedron*, **1962**, *18*, 205.

- [35] M. Grayson, C. E. Farley, *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 236.
- [36] R. S. Davidson, *J. Chem. Soc.* **1967**, 2131.
- [37] H. Jacobson, R. Harvey, E. V. Jensen, *J. Amer. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 6064.
- [38] D. N. Harpp, J. G. Gleason, *J. Amer. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2437.
- [39] J. P. Fackler, Jr., J. A. Fetschin, J. A. Smith, *J. Amer. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 2910.
- [40] A. J. Parker, N. Kharasch, *J. Amer. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 3071.
- [41] L. E. Overman, D. Matzinger, E. M. O'Connor, J. D. Overman, *J. Amer. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 6081.
- [42] A. Mokhir, R. Krämer, *Bioconj. Chem.* **2003**, *14(5)*, 877.
- [43] T. H. Fife, T. J. Przystas, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 1041.
- [44] G. L. Igloi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 8562.
- [45] D. Y. Wu, R. B. Wallace, *Gene* **1989**, *76*, 245.
- [46] J. Luo, D. E. Bergstrom, F. Barany, *Nucleic Acid Res.* **1996**, *24*, 3017.
- [47] J. Stoerker, J. D. Mayo, C. N. Tetzlaff, D. A. Sarracino, I. Schwoppe, C. Richert, *Nat. Biotechn.* **2000**, *18*, 1213 und darin enthaltene Referenzen.
- [48] a) P. F. Crain, J. A. Mc Closkey, *Curr. Opin. Biotechn.* **1998**, *9*, 25; b) F. Hillenkamp, M. Karas, *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 1993A.
- [49] a) K. Berlin, R. K. Jain, C. Tetzlaff, C. Steinbeck, C. Richert, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 63; b) D. Sarracino, C. Richert, *Bioorganic Med. Chem Lett.* **1996**, *6*, 2543.

- [50] Y. C. Ling, L. Lin, Y. T. Chen, *Rapid Comm. Mass Spec.* **1998**, *12(6)*, 317.
- [51] B. S. Gaylord, A. J. Heeger, G. C. Bazan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 10954.
- [52] A. E. Prichard, D. Kowalski, M. Laskowski, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 8652.
- [53] D. Kowalski, M. Laskowski, *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*; G. D. Fasman, Ed.; The Chemical Rubber: Cleveland, OH, **1976**; Vol. 2, pp 491-531.

**Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen:**

„Hybridization dependent cleavage of internally modified disulfide-peptide nucleic acids“

Iris Boll, Roland Krämer, Andriy Mokhir, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 505-509.

„Templated metal catalysis for single nucleotide specific DNA sequence detection“

Iris Boll, Roland Krämer, Jens Brunner, Andriy Mokhir, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, ASAP,  
DOI: 10.1021/ 0503332.



An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Andriy Mokhir für seine Ratschläge, seine Hilfsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit und zahlreiche fachliche Diskussionen bedanken.

Herrn Professor Dr. Roland Krämer danke ich für seine Ratschläge, die großzügige Förderung sowie die Gewährleistung ausgezeichneter Arbeitsbedingungen.

Für die angenehme Zusammenarbeit und die gute Organisation im Labor möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises bedanken.

Bei Claudia Dienemann, Karin Gabel und Heike Vongerichten möchte ich mich für die gute Organisation des „alltäglichen Laborbetriebs“ bedanken.

Meinen Laborkollegen Jens Brunner, Mareike Göritz, Nora Härdle, Gosia Jagoda, Radek Kierat, Andriy Mokhir, Patrick Plitt, Stefan Wörl und Felix Zelder danke ich besonders für das angenehme Arbeitsklima und die schöne Zeit.

Nora Härdle, Tobias Graf und Radek Kierat danke ich außerdem für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bei meinen Eltern möchte ich mich für ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht bedanken.

Zum Schluß noch einen besonderen Dank an die Bratze.

Erklärungen gemäß § 8 (3) b) und c) der Promotionsordnung:

a) ich erkläre hiermit, daß ich die vorgelegte Dissertation selbst verfaßt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe,

b) ich erkläre hiermit, daß ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Heidelberg, den 19.05.2005

.....  
(Iris Boll)